

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Asociación del polimorfismo genético de las IL-1A C(-889)T Y IL-1B C(+3953/4)T en un grupo de adultos con periodontitis crónica

TESIS

Para optar el grado académico de magíster en Biología Molecular

AUTOR

Ivonne Fanny Reyes Mandujano

Lima – Perú

2015

Dedicado Con mucho Cariño y Agradecimiento A:

Dios, por darme el privilegio de conocer a tanta gente para compartir y aprender de ellos, por vivir todas las experiencias que he vivido, las que vivo y las que viviré, siempre segura y confiando en él.

Mis grandes padres: Helmer y Epifania, por su esfuerzo, dedicación, comprensión, consejos, gran ejemplo y apoyo incondicional.

Mi muy querido hermano Rubén por sus consejos, apoyo, y por compartir sus experiencias conmigo.

Toda mi familia y amigos que alimentan cada momento de mi vida, me alientan, aconsejan, apoyan, etc. Miguel, Cristian, Dan, Patricia, Elizabeth, Hada, Jenny, Dora, Narda, Rosio, Nadia, Heydy, Claudia, Pedro, Aldo, Evelyn, Amilcar, Luis, Rebeca, Marcela, Jennifer, Marco, y otros tantos a quienes tengo igual aprecio y estima.

Dr. José Enrique Olivera García, al Dr. Manuel Taboada Vega, Dra. Martha Valdivia. Cuya y Dra. Libertad Alzamora Gonzales, grandes maestros y fuente inagotable de inspiración, información y gran conocimiento.

“Dios, dame la serenidad de aceptar las cosas que no puedo cambiar, valor para cambiar las cosas que puedo; y sabiduría para conocer la diferencia”

Anónimo

AGRADECIMIENTOS

Mi especial agradecimiento, a todo el equipo del Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina –UNMSM, que está dirigido por el Dr. Manuel Taboada Vega y el Dr. José Olivera García, a quienes agradezco su apoyo, total disposición y guía para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. José Olivera García por su apoyo y disposición para enseñar, coordinar y compartir sus experiencias, que han permitido la ejecución de esta tesis.

Al Dr. Manuel Taboada por su apoyo y confianza, y por buscar oportunidades para la ejecución de las campañas de salud y la realización de esta tesis.

Al Dr. Amilcar Ascarza, especialista en periodoncia, por su colaboración en el diagnóstico de los participantes incluidos en este estudio.

A Patricia Galván, Amilcar Ascarza , Aldo Yactayo, Evelyn Leyva, Luis Zuñiga y Wilbert Cruz por compartir sus experiencias, por todo su apoyo, por su voluntad para el trabajo, por su disposición para construir conocimiento y por sus grandes aportes al laboratorio y sobre todo por ser grandes amigos, grandes profesionales y grandes personas.

El desarrollo de esta investigación contó con el apoyo económico del Fondo de Innovación de Ciencia y Tecnología FINCyT, Resolución Directoral N° 30-2008-PCM/FINCyT, contrato N°001-FINCyT-PIBAP 2008 y se realizó en el Laboratorio II-5 de Genética Molecular del CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA Y NUTRICIÓN – FACULTAD DE MEDICINA-UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, a quienes también me gustaría brindarles mi agradecimiento.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	I
INDICE DE FIGURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
HIPOTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
METODOLOGÍA	15
1. Tipo y diseño del estudio	15
2. Población de estudio.....	15
2.1. Consideraciones éticas.....	15
3. Criterios de inclusión (comunes a los dos grupos).....	16
4. Criterios de exclusión (comunes a los dos grupos)	16
5. Procedimientos de recolección de datos y muestra	16
6. Análisis molecular de las muestras.	18
6.1. Aislamiento del ADN genómico	18
6.2. Genotipificación IL-1A C(-889)T	18
6.3. Genotipificación IL-1B C(+3953/4)T	19
7. Análisis de datos	20
RESULTADOS	21
1. Distribución de factores sociodemográficos en la población de estudio.	21
2. Equilibrio de Hardy Weinberg en la población de estudio.	23
3. Características genotípicas de la población de estudio.	25
4. Asociación de los polimorfismo de la IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica.	28
5. Asociación y asociación dosis - respuesta (tendencia) del genotipo compuesto de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica en la población de estudio	29

6. Determinar la asociación y asociación dosis - respuesta (tendencia) entre el genotipo de IL1 y factores sociodemográficos con la periodontitis crónica en la población de estudio	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES	42
LIMITACIONES	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	52
ANEXO 1: DISEÑO DEL ESTUDIO	52
ANEXO 2: PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS	53
ANEXO 3: PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	54
ANEXO 4: PROTOCOLO - RFLP PARA IL-1A C(-889)T	56
ANEXO 5: PROTOCOLO- RFLP PARA IL-1B C(+3953/4)T	60
ANEXO 6: ACTA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO Y FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de factores sociodemográficos en casos y controles	22
Tabla 2. Frecuencia de Periodontitis Crónica según las variables: sexo, grupo etario y frecuencia de cepillado dental.	23
Tabla 3. Frecuencias genotípicas de la IL-1A C(-889)T en la población de controles.....	23
Tabla 4. Cálculo del Chi-cuadrado para determinar el Equilibrio de Hardy-Weinberg para la IL 1-A (-889).	24
Tabla 5. Frecuencias genotípicas de la IL-1B C(+3953/4)T en la población de controles.....	24
Tabla 6. Cálculo del Chi-cuadrado para determinar el Equilibrio de Hardy-Weinberg para la IL-1B C(+3953/4)T.	25
Tabla 7. Frecuencia del genotipo IL-1A C(-889)T según las variables: sexo, grupo etario y frecuencia de cepillado dental.	25
Tabla 8. Frecuencia del genotipo IL-1B C(+3953/4)T según las variables: sexo, grupo etario y frecuencia de cepillado dental.	26
Tabla 9. Frecuencia del genotipo positivo IL-1A C(-889)T e IL-1B C(+3953/4)T* según las variables: sexo, grupo etario y frecuencia de cepillado dental.	27
Tabla 10. Frecuencia del alelo 2 en el genotipo compuesto (IL1A / IL1-B) según las variables: sexo, grupo etario y frecuencia de cepillado dental.....	27
Tabla 11. Distribución del genotipo de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T en casos y controles en la población de estudio.	28
Tabla 12. Asociación del genotipo positivo de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica en la población de estudio.	29
Tabla 13. Asociación y asociación dosis – respuesta del genotipo compuesto de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica en la población de estudio.....	30
Tabla 14. Asociación de tendencia de la variable grupo etario con la periodontitis crónica en la población de estudio.	31
Tabla 15. Asociación de tendencia de la variable grado de instrucción con la periodontitis crónica en la población de estudio.	32
Tabla 16. Protocolo para el Mix de PCR IL-1A C(-889)T, volumen de reacción 50 µl.	57

Tabla 17. Protocolo para el Mix de restricción para amplificados IL-1A C(-889)T, volumen de reacción 31.5 µl	58
Tabla 18. Protocolo para el Mix de PCR IL-1B C(+3953/4)T, volumen de reacción 50 µl.	61
Tabla 19. Protocolo para el Mix de restricción para Amplificados IL-1B C(+3953/4)T Volumen de reacción 31.5 µl.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Región q13-q21 del cromosoma 2, donde se ubican los genes de la IL-1A, IL-1B y IL-1RN (Vélez –Castrillón, 2004).	6
Figura 2. Estructura del locus de la IL-1 incluida dentro del brazo largo del cromosoma 2. Se muestran los sitios polimórficos del la IL-1A y la IL-1B (Balkwill, 2000).	6
Figura 3. Acción de la enzima de restricción Nco I, sobre el amplicón de 99 pb de la IL-1A y los fragmentos generados.	8
Figura 4. Acción de la enzima de restricción Taq I, sobre el amplicón de 196pb de la IL-1B y los fragmentos generados.	9
Figura 5. Proceso de obtención de las muestras. A) Sesiones educativas acerca de la periodontitis; B) Diagnóstico de periodontitis crónica; C) Firma de consentimiento informado y llenado del cuestionario y F) Toma de muestra de sangre.	18
Figura 6. Amplificados de IL-1A C(-889)T de 99 pb, en gel de agarosa Top Vision™ al 2.4% , tinción Syber-Green 0.012%. También se observa el patrón de bandas del ladder Gene Ruler TM de 50 -1000 pb Fermentas®.	58
Figura 7. Fragmentos de restricción de IL-1A C(-889)T de 99pb y 83pb en gel de poliacrilamida al 8%, tinción nitrato de plata. También se observa el patrón de bandas del Ladder Marker de 10 bp- 100 pb, Promega®.	59
Figura 8. Amplificados de IL-1B C(+3953/4)T de 196 pb, en gel de agarosa Top Vision™ al 2.4%, Tinción Syber-Green 0.012%. También se observa el patrón de bandas del ladder Gene Ruler TM de 50 -1000 pb, Fermentas®.	62
Figura 9. Fragmentos de restricción de IL-1B C(+3953/4)T de 196 pb, 97 pb y 85pb en gel de poliacrilamida al 8%, tinción nitrato de plata. También se observa el patrón de bandas del ladder Gene Ruler TM de 50 -1000 pb, Fermentas®.	63

RESUMEN

La periodontitis crónica es la causa más común de pérdida de dientes en el mundo y muchos factores de riesgo tales como las infecciones, la respuesta inflamatoria, la higiene oral, la edad, los hábitos de fumar y las características genéticas individuales están involucrados en el desarrollo de esta enfermedad. La identificación de los factores genéticos que condicionan la inflamación oral puede ayudarnos a comprender la predisposición a desarrollar periodontitis. Las interleuquinas, en especial la IL-1, tienen mucha importancia en la evolución de la enfermedad periodontal, debido a que son proteínas solubles que median interacciones complejas entre los linfocitos, las células inflamatorias y otros elementos celulares del tejido conectivo. Por tal motivo, el propósito de este estudio fue determinar la asociación de los polimorfismos genéticos de la IL-1A C(-889)T, IL-1B C(+3953/4)T, con la periodontitis crónica en un grupo de peruanos. Para ello se reclutaron 94 personas con periodontitis crónica y 96 personas periodontalmente sanas, a quienes se les extrajo una muestra de sangre para obtener el ADN y realizar la genotipificación de la IL-1A e IL-1B, con la técnica de PCR-RFLP. Los datos fueron analizados con el test de χ^2 , χ^2 de tendencia lineal y regresión logística, con un 95% de intervalo de confianza. Los resultados muestran una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo positivo de la IL-1B y el genotipo compuesto positivo, con la periodontitis crónica.

Palabras clave: Interleuquinas, Citoquinas, Periodontitis Crónica, Polimorfismo Genético, PCR- RFLP.

ABSTRACT

Chronic periodontitis is the most common cause of tooth loss in the world and many risk factors such as infections, inflammatory response, oral hygiene, age, smoking habits and individual genetic characteristics are involved in the development of this disease. The identification of genetic factors that influence oral inflammation may help us understand the predisposition to developing periodontitis. Interleukins, in particular IL-1, are very important in the development of periodontal disease because they are soluble proteins that mediate complex interactions among cells, inflammatory cells and other cellular elements of connective tissue. Therefore the purpose of this study was to determine the association of genetic polymorphisms of the IL-1A C (-889) T, IL-1B C (+3953/4) T, with chronic periodontitis in a group of Peruvians. For this purpose, 94 people with chronic periodontitis and 96 periodontally healthy people were recruited and blood for DNA and perform genotyping of IL-1A and IL-1B, with the PCR-RFLP was extracted to them. Data were analyzed with the test χ^2 , χ^2 of linear trend and logistic regression with 95% confidence interval. The results show a statistically significant association between positive genotype of the IL-1B and the positive composite genotype with chronic periodontitis.

Keywords: Interleukins, cytokines, Chronic Periodontitis, Genetic Polymorphism, PCR-RFLP.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad infecciosa crónica y compleja del tejido que soportan los dientes (ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar) y es considerada como la causa más común de la pérdida de dientes entre los adultos a nivel mundial (García & Magaña, 2008; Weam & Muteb, 2014; Petersen, 2003). La patogenia de esta enfermedad se inicia con la colonización de bacterias cariogénicas en el microambiente gingival de un huésped susceptible; posteriormente en el tiempo dicha colonización provoca la destrucción tisular característica de la periodontitis como parte de una respuesta del huésped contra estos organismos. Principalmente este proceso tiene una estrecha relación con la pobreza, la depresión, la falta de apoyo social (Petersen & Ogawa, 2005); pero además la condición genética, jugaría un papel importante en la predisposición y la progresión de la periodontitis crónica (Donati, 2009).

Las citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF- α , así como sus variaciones genéticas, median las respuestas inflamatorias por la atracción y activación de las células blanco hacia los tejidos y la estimulación de la secreción de otras citoquinas linfocitotrópicas y enzimas catabólicas. En la infección aguda la respuesta inflamatoria ayuda a contener y erradicar al patógeno; sin embargo en las enfermedades inflamatorias crónicas, la producción de estas citoquinas causan daño al tejido (Balkwill, 2000).

Yoshie *et al.* (2005) han identificado genes candidatos que podrían actuar como posibles factores de riesgo o de protección para la enfermedad periodontal, las que se centran generalmente en citoquinas inflamatorias, receptores de la superficie celular, enzimas y factores relacionados; entre estos se mencionan a Interleuquina-1 (IL-1), el receptor Fc γ , TNF, IL-2, -4, -6, -10 y el receptor de la vitamina D. De estos la IL-1 ha tenido mayor atención por la mayor cantidad de publicaciones en diferentes polimorfismos reportados (A-889, A+4845, B+3954, RN) (Yoshie *et al.*, 2005). Por otro lado, Vargas (2012) refiere lo mismo y concluye que la mayoría de estos estudios se han realizado en poblaciones caucásicas y/o asiáticas, y dada las diferentes características genéticas que tienen los

pobladores de países sudamericanos, estos estudios no podrían ser extrapolados tan fácilmente.

La IL-1 es una potente citoquina inflamatoria e inmunoreguladora, es el activador primario de citoquinas tempranas y es responsable de la inducción de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales facilitando de esta manera la migración de los leucocitos desde los vasos sanguíneos a los tejidos. La producción y liberación prolongada de IL-1 y sus efectos biológicos, pueden aumentar el riesgo de daños patológicos. Por lo tanto, la producción de IL-1 debe estar fuertemente regulada a distintos niveles incluyendo la producción, disponibilidad en el sitio de inflamación y función biológica mediada por receptores (Vélez-Castrillón., *et al* 2004)

Las acciones biológicas de la IL-1 se basan en la inducción de genes que codifican para la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2), la fosfolipasa A tipo 2 (PLAT2) y la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), las que conducen a la producción de prostaglandinas E2 (PGE2), metaloproteinasas y sus inhibidores. Actualmente, existe un interés creciente en el estudio de los polimorfismos de los genes que codifican para cada uno de los miembros de la superfamilia de la IL-1, pues parecen afectar la expresión proteica de las citoquinas ya sea por aumento o por defecto, y de esta manera afectan el fenotipo de la enfermedad (Balkwill, 2000). Dentro de la enfermedad periodontal, la IL-1 es una de las más activas estimuladoras de la actividad osteoclástica (osteolisis) (Moreira *et al.*, 2005).

Los agonistas de la IL-1 (IL-1 α , IL-1 β) son producidos por macrófagos, monocitos, keratinocitos y células dendríticas, células del músculo liso y endoteliales. La IL-1 α es regulador de eventos intracelulares y mediador de la inflamación local, mientras la IL-1 β es una proteína extracelular. Estas proteínas son codificadas por los genes IL-1A, IL-1B, respectivamente; los cuales están agrupados en el cromosoma 2q13-21 y son polimórficos en diversos *loci* que están relacionados con la periodontitis, lo que ha generado el interés en numerosos estudios epidemiológicos (Nikolopoulos *et al.*, 2008). Uno de estos

polimorfismos es C(-889)T conocido también como rs1800587 (IL-1A) y el otro es el polimorfismo C(+3953/4)T o rs1143634 (IL-1B).

Considerando que la periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica grave y frecuente en los seres humanos; que los factores ambientales tales como la infección por bacterias específicas en niveles altos, el tabaquismo y la pobreza, están implicados en gran medida en la ocurrencia de la enfermedad periodontal; que además, existe una potencial predisposición multigénica en su desarrollo; que la frecuencia genotípica de estos polimorfismos varían entre grupos étnicos y poblaciones geográficamente distintas y que estudios sobre polimorfismos de estos genes y su relación con la periodontitis son aún desconocidos para la población peruana, se buscó entender como los polimorfismos genéticos en la IL-1 pueden influir en la susceptibilidad de las personas a hacer periodontitis crónica en nuestra población.

La información proporcionada podría servir para que futuras intervenciones se orienten, a dirigir los recursos disponibles en salud bucal, sobre aquellos individuos o grupos de individuos que estén más propensos a desarrollar la enfermedad periodontal; es decir, aquellos en riesgo. El conocimiento en el tema contribuirá a vigilar la salud bucal y llevar a cabo programas o estrategias de prevención y tratamiento. La importancia puede ser expresada tanto en términos de salud oral, psicológica, económica y social ya que se provee información para el desarrollo de futuras investigaciones; así como para la toma de decisiones en base a evidencia científica.

ANTECEDENTES

Si bien es cierto la presencia de bacterias patógenas en el microambiente bucal son el desencadenante de la enfermedad periodontal, la infección no siempre se asocia con la pérdida del hueso, ya que ni el tipo o la proporción de estos patógenos asociados explica la variabilidad de la severidad en la enfermedad periodontal. Actualmente se considera que es la respuesta del huésped hacia la bacteria, la responsable del daño periodontal; los hechos que sugieren esta aseveración son: 1) los procesos homeostáticos del hueso y la respuesta inmunitaria están íntimamente relacionados, ya que la remodelación ósea está regulada por muchos factores inmunológicos, 2) se ha visto que la infección oral con bacterias periodontales induce la resorción ósea en los modelos animales, 3) los estudios *in vitro* establecen que las bacterias inducen la secreción de factores remodeladores de hueso en células del sistema inmune y los estudios *in vivo* demuestran que ratones deficientes de células inmunes pierden menos hueso que los animales normales después de la infección oral, y 4) en infecciones inducidas, la resorción ósea mediada por la respuesta inmune, ocurre en pacientes con enfermedad periodontal, ya que las citoquinas resorptivas y las fuentes celulares de éstas se encuentran presentes en la encía inflamada (Castrillón., *et al* 2007)

Los estudios en gemelos monocigóticos y dicigóticos analizados juntos y separados muestran que el componente genético, es más significativo para desarrollar gingivitis, bolsas periodontales y placa microbiana que otras variables encontradas en la misma población (Zerón, 2006; Michalowicz *et al.*, 1991; Michalowicz *et al.*, 1991)

Los marcadores genéticos o moleculares permiten medir la variabilidad genética heredable entre individuos (polimorfismo genético), de esta manera establecer posibles diferencias entre individuos sanos y enfermos. Existen tres tipos de polimorfismos a nivel genético: *Single Nucleotide Polimorphism* (SNP), *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR) y *Copy Number Variations* (CNV). Los SNPs son los polimorfismos más frecuentes y los más analizados en la

actualidad; son polimorfismos de un cambio en un nucleótido en una posición concreta del genoma. El cambio de un único nucleótido en una zona codificante puede provocar un cambio de aminoácido en la proteína resultante, y ello puede resultar en una modificación de su actividad o función. Así por ejemplo, los diferentes niveles de la secreción de las citoquinas en respuesta a la exposición de las bacterias podría explicar las distintas respuestas individuales frente la enfermedad periodontal (Gemmell *et al.*,1997; Kjeldsen *et al.*,1995). Los cambios también pueden ocurrir en regiones promotoras de un gen y modificar su expresión; estas zonas promotoras modulan el proceso de transcripción del ADN en ARN, aún si el cambio se produce en un *intrón* (aquí no se traducen proteínas) de igual forma, los cambios en su estructura pueden modular la expresión del gen.

Los estudios de asociación comparan las frecuencias de los genotipos de una serie de SNPs entre casos y controles no relacionados de una muestra de una población dada. El hecho de encontrar un SNP asociado con la enfermedad no necesariamente quiere decir que sea el responsable de la misma; pues puede darse el caso de que el SNP esté en desequilibrio de ligamiento (LD), es decir, correlacionado con el verdadero SNP causal o los resultados estén sesgados por lo que se conoce como estratificación poblacional (por la existencia de muchas razas o etnias) (Sevilla, 2007).

Para analizar la asociación entre un SNP y la enfermedad, debemos comprobar que dado un SNP y su frecuencia alélica para una población específica se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW); para ello se suele utilizar una prueba de bondad de ajuste de Chi-cuadrado; donde la hipótesis nula es que el SNP cumple con el EHW, por lo que se tienen que obtener *p*-valores mayores a 0.05.

Las citoquinas, IL-1 α e IL-1 β , son codificadas por dos genes, de longitudes diferentes (IL-1A de 12kb y de IL-1B de 9,7kb), ambas se encuentran ubicadas en el cromosoma 2 región q13-21 (Figura 1). A nivel de ADN, ambos genes muestran una homología de aproximadamente 45%; tienen una organización similar que comprende 7 exones; el promotor de la IL-B es de 10 a 50 veces más fuerte que

el de la IL-1A y no existen cajas TATA en la región promotora del gen de IL-1A, por el contrario, la región promotora de IL-1B contiene una caja TATA y un motivo típico de los genes inducibles (Vélez-Castrillón *et al.*, 2004). Los polimorfismos de los genotipos de IL-1A, IL-1B (Figura 2) son considerados factores de riesgo potenciales para la destrucción periodontal (Zerón, 2006).

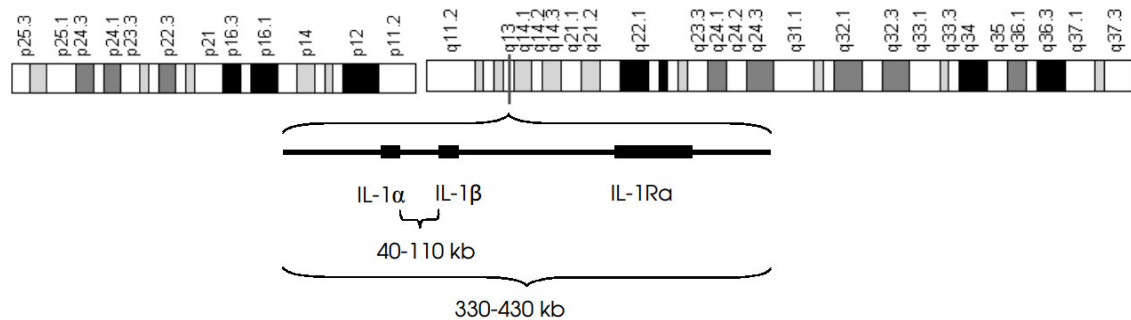


Figura 1. Región q13-q21 del cromosoma 2, donde se ubican los genes de la IL-1A, IL-1B y IL-1RN (Vélez –Castrillón, 2004).

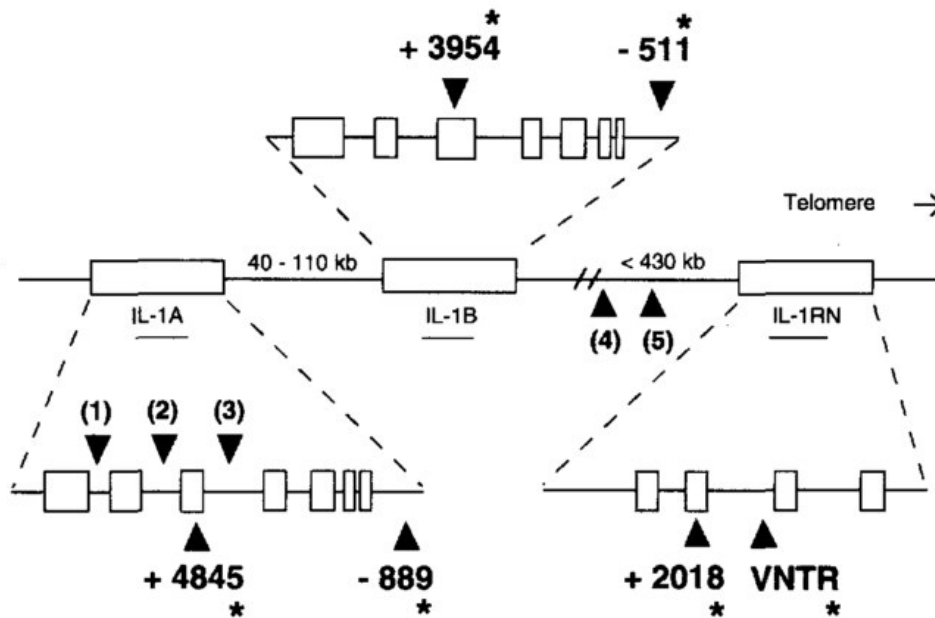


Figura 2. Estructura del locus de la IL-1 incluida dentro del brazo largo del cromosoma 2. Se muestran los sitios polimórficos de la IL-1A y la IL-1B (Balkwill, 2000).

Para determinar el polimorfismo de regiones homólogas de ADN entre individuos; se emplea la técnica molecular de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Esta técnica involucra la fragmentación de la muestra de ADN mediante la acción de una enzima de restricción, la cual puede reconocer y cortar el ADN en todo lugar donde una cierta secuencia específica palindrómica se encuentre presente. Las enzimas de restricción se caracterizan porque producen dos cortes, uno en cada cadena del ADN dúplex y lo hacen de forma específica tras reconocer su secuencia “blanco”. El blanco de reconocimiento y corte de las enzimas de restricción generalmente es una secuencia palindrómica, lo que significa que cada una de las cadenas puede dividirse en dos mitades que son complementarias. Los fragmentos resultantes de la digestión se separan de acuerdo a su longitud mediante electroforesis en gel de agarosa, donde se pueden visualizar las bandas, considerando cada longitud como un alelo, permitiendo discriminar entre individuos homocigotos o heterocigotos debidos a un polimorfismo de un solo nucleótido (Cumbal, 2010).

En general, los resultados de la evaluación de la IL- 1 en la enfermedad periodontal señalan que la IL-1 α y la IL-1 β están presentes en la encía inflamada y en el fluido gingival crevicular de los pacientes con periodontitis y en concentraciones extremadamente bajas en pacientes sanos (Castrillón., *et al* 2007). Debido a ello los polimorfismos de la IL-1 vienen siendo descritos, así como el efecto sobre su expresión; tal es así que el polimorfismo -889 T \rightarrow C en la región promotora de la IL-1A (incremento del alelo T y del Genotipo TT) aumenta la producción de ARNm y por ende la proteína en el plasma (Vélez-Castrillón *et al.*, 2004). Por otro lado se ha encontrado que los SNPs en la región promotora y *enhancer* tienen actividad funcional (Chen *et al.*, 2006).

La enzima de restricción *Nco I*, reconoce el sitio 5'- C CATGG-3' 3'-GGTAC C-5, dentro del fragmento amplificado de la IL-1A. El genotipo CC, se determina al observar una banda resultante de la digestión (99pb); el genotipo homocigoto TT se confirma al observar una única banda (83pb) y el genotipo heterocigótico CT se determina al observar dos bandas (99pb y 83pb) (Figura 3). La presencia de una sola banda corresponde a la ausencia de sitios reconocibles para la enzima en ambas cadenas del producto amplificado, razón por la cual la

enzima no produce cortes (5'- C CATGG-3' 3'- GGTA C-5' genotipo homocigoto TT de 99pb; alelo 2). La presencia de tres bandas individuales en el gel corresponden a la longitud total del amplicón (99pb) y a los productos de su digestión total con la enzima *Nco I* (83pb y 16 pb; alelo 1) ((5'- C TATGG-3' 3'- GGTA T-5' genotipo heterocigoto CT o TC); Este genotipo resulta del reconocimiento del sitio de restricción en una sola cadena del producto PCR, por ende se generan dos fragmentos y uno tercero que corresponde a la cadena intacta que no fue digerida.

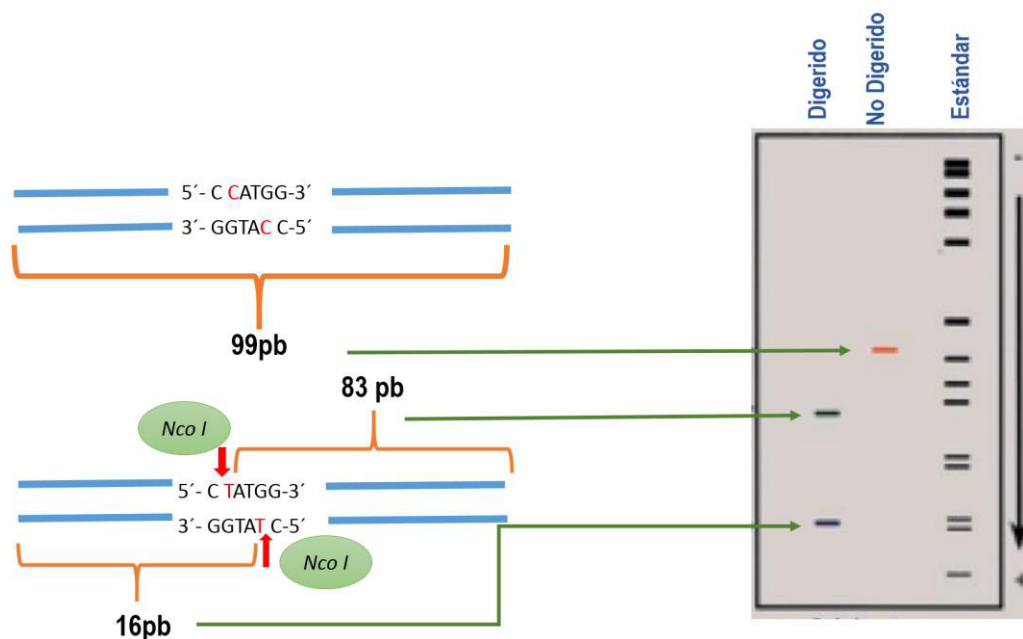


Figura 3. Acción de la enzima de restricción *Nco I*, sobre el amplicón de 99 pb de la IL-1A y los fragmentos generados.

Asimismo el polimorfismo +3953/4 (nt5887) C→T del exón 5 de la IL-1B se asocia con un aumento de producción de citoquina según el genotipo (TT>CT>CC) (Vélez-castrillón et al., 2004). La enzima *Taq I* reconoce el sitio 5'- T CGA-3' 3'- AGC T-5', dentro del fragmento amplificado de la IL-1B (Cumbal, 2010); el genotipo homocigoto CC se determina al observar 2 bandas resultantes de la digestión (97bp + 85bp; alelo 1), el genotipo homocigoto TT se confirma al observar una única banda de 196bp (alelo 2) y el genotipo heterocigoto CT se determina al observar 3 bandas (196bp, 97bp y 85bp) (Figura 4). La presencia de una sola banda corresponde a la ausencia de sitios reconocibles para la enzima en ambas cadenas del producto amplificado, razón por la cual la enzima no

produce cortes (5'- T **C**GA-3' 3'- AG**C** T-5' genotipo homocigoto TT de 196pb). La presencia de tres bandas individuales en el gel corresponden a la longitud total del amplicón (196pb) y a los productos de su digestión total con la enzima *Taq I* (97pb y 85 pb) (5'- TT**G**A-3' 3'- AGT**T**-5' Genotipo heterocigoto CT o TC); este genotipo resulta del reconocimiento del sitio de restricción en una sola cadena del producto PCR, por ende se generan dos fragmentos y uno tercero que corresponde a la cadena intacta que no fue digerida.

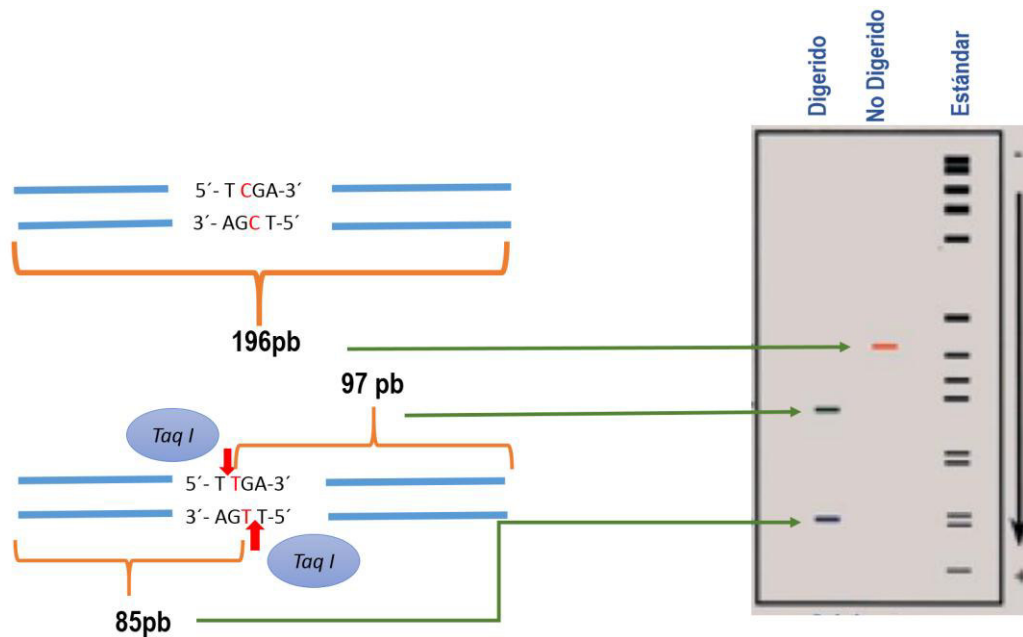


Figura 4. Acción de la enzima de restricción *Taq I*, sobre el amplicón de 196pb de la IL-1B y los fragmentos generados.

La composición del genotipo que se ha asociado con la periodontitis más severa comprende al alelo 2 del polimorfismo -889 de IL-1A más el alelo 2 del polimorfismo +3953 (o IL-1B +3953) del gen de IL-1B. En este último caso, se asocia con una producción elevada de IL-1 β en monocitos de sangre periférica estimulados con lipopolisacáridos (LPS). Por lo tanto, el portar el genotipo asociado con periodontitis puede resultar en el incremento en la producción de IL-1 β en tejidos locales. La participación genética del polimorfismo en IL-1 ha demostrado mayor susceptibilidad a la aparición de cuadros clínicos severos cuando se presenta el alelo 2 del polimorfismo de la IL-1B (+3953/4) en algunas poblaciones (Castrillón., *et al.* 2007)

La distribución de la enfermedad periodontal con respecto a la prevalencia y a la severidad difiere entre los países de acuerdo a la raza o grupo étnico. Algunas fuentes no oficiales refieren que la prevalencia de la periodontitis en el Perú para el 2006 fue de 85%; mientras que para el 2009, las estadísticas del Sistema de Información de Salud (HIS) del Ministerio de Salud reportaron, que las enfermedades bucales de los tejidos duros (dentro de los cuales se encuentra la periodontitis), ocuparon el segundo lugar de la morbilidad general de la consulta externa a nivel nacional (Dirección General de Epidemiológica & Ministerio de Salud, 2009). Otros datos de prevalencia provenientes de fuentes más confiables, no se encontraron; sin embargo buscando los casos de periodontitis por año, en distintos centros de salud; evidenciamos que pese a existir y reconocer la enfermedad periodontal, estos no son registrados en la hoja HIS debido a que el Manual de Registros y Codificación de Diagnóstico de Consulta Externa y Otras Actividades de Salud (Health Information System–HIS), tiene cerca de 13 calificaciones para los distintos tipos de Periodontitis no comprendidos por los profesionales odontólogos en el Perú o simplemente por no contar con los instrumentos y tiempo suficiente para dar un diagnóstico más específico de la enfermedad. Esto manifiesta la poca importancia que tiene esta enfermedad, en el sistema de salud nacional, pese al impacto que pudiera tener sobre la salud en general (Otomo-Corgel *et al.*, 2012). Muy por el contrario otros países, principalmente occidentales, tienen datos actuales de prevalencia, estudios epidemiológicos e incluso estudios a nivel molecular que ayudan y muestran una fuerte asociación entre los polimorfismos de genes de citoquina y la enfermedad periodontal.

Si bien es cierto la periodontitis, directamente no es una enfermedad mortal, estudios epidemiológicos han demostrado una fuerte asociación entre la enfermedad periodontal y las enfermedades sistémicas serias, tales como la diabetes (Sukumaran & Hamdan, 2006; Rojo *et al.*, 2011). Es así que estudios realizados en la población estadounidense muestran que la prevalencia de diabetes en pacientes con periodontitis es alrededor del doble sobre aquellos sin compromiso periodontal (Teng *et al.*, 2002); del mismo modo, la periodontitis se encuentra asociada a la arteriosclerosis y enfermedades coronarias (Lalla *et al.*,

2003; Cairo *et al.*, 2008; Destefano *et al.*, 1993; Beck *et al.*, 1999; Persson & Persson, 2008); neumonía (Scannapieco, 1999), esclerosis múltiple (Shapira *et al.*, 2005); parto prematuro y bajo peso en niños recién nacidos (Lizarraga & Proaño, 2005; Gomes-Filho *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2002; Jeffcoat *et al.*, 2003); el bajo peso de niños al nacer (Gomes-Filho *et al.*, 2007); los nacimientos prematuros (Agueda *et al.*, 2008); la pre-eclampsia (Canakci *et al.*, 2007), entre otras.

Se ha reportado la existencia de una asociación estadísticamente significativa de los polimorfismos de los genes IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con enfermedades periodontales crónicas, donde se refiere, que en pacientes positivos para los polimorfismos compuestos IL-A /IL-B, el riesgo de perder dientes por periodontitis se incrementa 2.7 veces al ser comparados con pacientes que presentan genotipo negativo (Nikolopoulos *et al.*, 2008; Ferro & Gómez, 2007). Se propone que los polimorfismos encontrados en los genes de las citoquinas pueden predisponer a los individuos a enfermedades periodontales, debido a que al parecer estos genes tienen un efecto regulador sobre la secreción de las mismas, aumentando o disminuyendo la producción de la citoquinas según el alelo que se está expresando. La premisa biológica de la prueba de susceptibilidad genética es que la presencia de alelo 2 de IL-1B C(+3953/4)T se asocia con una mayor propensión a secretar IL-1 β ante la estimulación de Lipopolisacáridos (LPS) microbianos (Agrawal *et al.*, 2006).

Una revisión sistemática y metanálisis, acerca de polimorfismos de genes de citoquina (IL-1A G(4845)T, IL-1A C(-889)T, IL-1B C(+3953/4)T, IL-1B T(-511)C, IL-6 G(-174)C y TNFA G(-308)A) y su asociación con la enfermedad periodontal (periodontitis agresiva y crónica) que incluyó 53 estudios (4178 casos y 4590 controles), encontró una asociación estadísticamente significativa de los polimorfismos de los genes de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica, sin ninguna evidencia de sesgo de publicación o heterogeneidad estadística. En relación al polimorfismo de la IL-1A, para la población descendiente caucásica y asiática, el riesgo relativo del alelo T para periodontitis crónica fue de OR: 1.310, 95%, IC: 0.959-1.789; solo el subgrupo de

los caucásicos produjo una medida significativa del efecto (OR: 1,314, 95%, IC: 1.031-1.674); un riesgo mayor para la periodontitis crónica se demostró en los sujetos que llevan el genotipo (TT o TC) (OR: 1,570, 95%, IC: 1.110- 2,221). En el caso de IL-1B C(+3953/4)T y la periodontitis crónica, los portadores del alelo T, presentaron un incremento en un 45% del riesgo a desarrollar periodontitis crónica (OR: 1.447, 95%, IC: 1.129,-1.854). Los contrastes TT *versus* CT+CC y TT+CT *versus* CC proporcionaron evidencia de una asociación entre el polimorfismo de la IL-1B C(+3953/4)T y periodontitis crónica (OR: 1.604, 95%, IC: 1.113-2.311 y OR:1.498, 95%, IC: 1.164-1.928; respectivamente). En la población asiática se observó una fuerte asociación al comparar sujetos portadores del genotipo TT o CT con el homocigoto CC (OR: 2.424, 95% CI: 1.493, 3.937). El efecto del genotipo compuesto (IL-1A C(-889)T/IL-1B C(+3953/4)T) positivo fue más frecuente entre los casos de periodontitis que en los controles, a pesar de que la estimación no fue significativa (OR: 1.422, 95%, IC: 0.981-2,061). Sin embargo, los caucásicos portadores del genotipo positivo tenían un riesgo estadísticamente significativo para desarrollar periodontitis crónica (OR: 1,664, 95%, IC: 1.065-2.602). Si simultáneamente los sujetos son portadores del alelo T en los loci IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T, el riesgo a desarrollar periodontitis crónica fue mayor comparados a los efectos por separado (Nikolopoulos *et al.*, 2008). Este hecho indica un efecto dosis- respuesta y de acuerdo con los criterios de Hill de casualidad (Rothman & Greenland, 2005), son una fuerte indicación de una verdadera relación etiológica relativa a las variantes genéticas particulares y la enfermedad.

Otro estudio que buscaba determinar la prevalencia de los polimorfismos de la IL-1A C(-889)T e IL-1B C(+3953/4)T en chilenos y su asociación con la periodontitis apoyaron la asociación entre la variación en los sitios polimórficos en los genes de la IL-1 y el riesgo a la enfermedad periodontal. La alta frecuencia de heterocigotos de IL-1A en el grupo de casos (42.40%) en relación al grupo control (33.66%) evidencia que están asociadas con la periodontitis. El genotipo más frecuente de la IL-1B era homocigoto para el alelo 1, que era más frecuente en los controles (87.12%) que en los casos (70.30%), lo que se calificaría como un factor protector para la Periodontitis (OR: 0.42, 95%, IC: 0.24-0.74, $p=0.003$), mientras que el genotipo heterocigoto de la IL-1B mostró una fuerte asociación positiva con

la periodontitis (OR: 3.12, 95%, CI: 1.59-6.09, $p=0.001$). Los sujetos con genotipo positivo tuvieron tres veces más probabilidades de desarrollar periodontitis (inicial, moderada o grave) (López *et al.*, 2005) .

Los resultados de un metanálisis, que buscaba determinar la asociación entre el polimorfismo IL-1A C(-889)T y la periodontitis agresiva, mostró que el polimorfismo IL-1A C(-889)T no está asociado con la susceptibilidad a la periodontitis agresiva, el alelo T vs C (OR: 1, 95%, IC: 0.88-1.14, $p = 0.98$) (Wang, 2014).

En el Perú, los estudios de asociación genética y la enfermedad periodontal son muy escasos; sin embargo se ha logrado evaluar el polimorfismo (-308G/A) del gen del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) en una muestra de pacientes peruanos adultos, y analizar su relación con los procesos periodontales llegando a la conclusión de que no existe una asociación significativa entre este marcador y los procesos periodontales severos (Taboada *et al.*, 2007). Actualmente este equipo de trabajo de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, viene estudiando los marcadores como el MMP-1, TNFR2 + 582, IL-6 y su relación con la periodontitis crónica.

HIPOTESIS

Los Polimorfismos IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T de genes de IL-1 están asociado con la periodontitis crónica en una población peruana.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación de los polimorfismos IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica en una población peruana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir la distribución de factores sociodemográficos de la población de estudio
2. Determinar el Equilibrio de Hardy Weinberg en la población de estudio.
3. Determinar las frecuencias genotípicas en la población de estudio
4. Determinar la asociación de los polimorfismo de la IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica.
5. Determinar la asociación y asociación dosis - respuesta (tendencia) del genotipo compuesto de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica en la población de estudio.
6. Determinar la asociación y asociación dosis - respuesta (tendencia) entre el genotipo de IL1 y factores sociodemográficos con la periodontitis crónica en la población de estudio.

METODOLOGÍA

1. Tipo y diseño del estudio

El estudio fue de tipo analítico (se evaluó una presunta relación entre dos variables), prospectivo (se realizó una planificación para la toma de la muestra y los datos), transversal (se realizó la toma de la muestra y de datos una sola vez), observacional (no se controlan los factores de estudio). El diseño del estudio fue de casos y controles. Los casos fueron sujetos con periodontitis crónica; y los controles, sujetos sin periodontitis crónica.

2. Población de estudio

La población de estudio estuvo constituida por personas de 18 a 65 años de edad, reclutadas en diferentes zonas de la ciudad de Lima (San Juan de Lurigancho, 4.0%; San Martín de Porras, 3.0%; Independencia, 0.4%; Ate Vitarte, 10.4%; El Agustino, 3.7%; Santa Anita, 1.9%; Villa el Salvador, 0.8%; Cercado de Lima, 2.2%; San Luis, 23.4%; La Victoria, 49.4%; Ventanilla, 0.4%; Callao, 0.4%), a través de campañas de Salud, teniendo en consideración que las características socioeconómicas de la población sean parecidas o semejantes.

En total se reclutaron 269 personas las que fueron agrupadas en participantes con periodontitis o sanos siguiendo los criterios de inclusión del estudio. La descripción de la población obtenida en las campañas y la que finalmente fue analizada se detallan en el (ANEXO 1).

2.1. Consideraciones éticas

El presente estudio contó con la aprobación del Comité de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (ANEXO 6).

3. Criterios de inclusión (comunes a los dos grupos)

- Personas adultas (varones y mujeres) de entre 18 a 65 años
- Personas de “raza” mestiza, nacidos en Perú, al igual que sus progenitores.
- CASOS: Personas con diagnóstico de periodontitis crónica (leve, moderada y severa).
- CONTROLES: Personas periodontalmente saludables, se aceptaron participantes con gingivitis leve y moderada o caries dental.
- Personas que acepten participar voluntariamente en el estudio.

4. Criterios de exclusión (comunes a los dos grupos)

- Mujeres gestantes o en periodo de lactancia.
- Tener enfermedades que pudieran influenciar en el desarrollo de la Periodontitis (enfermedades sistémicas tales como la diabetes, hepatitis, VIH, desordenes inmunitarios problemas de coagulación, etc.).
- Declarar ser fumador
- Usar braquets, o prótesis dental
- Tomar medicamentos de forma crónica
- Tener diagnóstico de periodontitis agresiva.
- Se excluyeron los participantes que no contaron con el cuestionario completo o que no tengan diagnóstico de periodontitis completo.

5. Procedimientos de recolección de datos y muestra

Los participantes del estudio fueron reclutados a través de campañas de salud a nivel de comunidad, que incluyeron sesiones educativas sobre salud bucal, fluorización para los niños y exámenes de laboratorio. Las sesiones educativas se centraron en brindarles a los asistentes información acerca de la periodontitis sus causas, consecuencias y la prevención de la misma; durante el desarrollo de esta actividad se les informó de la investigación, los procedimientos, riesgos y beneficios así como se contestaron sus preguntas y dudas. Las personas interesadas en participar en el estudio recibieron un cuestionario para

ver si cumplían con los criterios de inclusión; y luego un consentimiento informado; estos documentos fueron llenados con el acompañamiento de un miembro de nuestro equipo.

Solo a los individuos que al examen odontológico resultaron con diagnóstico de periodontitis crónica o periodontalmente saludables y cumplían con los criterios de inclusión se les realizó la toma de muestra de sangre.

El diagnóstico de periodontitis crónica fue ejecutado por un profesional odontólogo especialista en periodoncia, miembro de nuestro equipo de investigación. Los signos clínicos que se consideraron por el médico periodontista fueron: formación de bolsas periodontales e inflamación gingival, sangrado al sondaje, movilidad dentaria aumentada, supuración y la medición de la profundidad del surco gingival con una sonda periodontal.

Según su extensión y severidad, los casos de periodontitis crónica fueron clasificados en:

- Periodontitis leve: cuando las pérdidas de inserción clínica son de 1 a 2 mm.
- Periodontitis moderada: si las pérdidas de inserción se encuentran entre 3 y 4 mm.
- Periodontitis severa: ante pérdidas de inserciones clínicas mayores o iguales a 5 mm.

Un biólogo entrenado obtuvo las muestras de sangre venosa empleando tubos con sistema de vacío de 5ml con anticoagulante (EDTA), siguiendo las normas internacionales de bioseguridad (Organización Mundial de la Salud, 2005), hasta obtener 4 ml de muestra. Estas fueron etiquetadas con el nombre completo del paciente, la fecha de la colecta y un código asignado por el laboratorio. Finalmente fueron transportadas hasta el laboratorio.



Figura 5. Proceso de obtención de las muestras. A) Sesiones educativas acerca de la periodontitis; B) Diagnóstico de periodontitis crónica; C) Firma de consentimiento informado y llenado del cuestionario y F) Toma de muestra de sangre.

6. Análisis molecular de las muestras.

6.1. Aislamiento del ADN genómico

El ADN genómico fue aislado de los leucocitos recuperados de la sangre de acuerdo a los métodos descritos en el ANEXO 2 y 3 que están basados en lo descrito por Balkwill (2000). La cuantificación del ADN obtenido y su calidad fue determinada haciendo uso del Nanodrop 2000.

6.2. Genotipificación IL-1A C(-889)T

Se utilizó la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar una sección de la región promotora del gen de la IL-1A C(-

889)T siguiendo el protocolo descrito en el ANEXO 4, basados en lo descrito por Balkwill (2000). El volumen final de la reacción fue de 50 µl conteniendo 100 ng de DNA genómico, buffer Taq 10X (NH₄)₂SO₄, 0.8 mM de dNTP mix, 25 mM MgCl₂, 1 µM de cada uno de los primers: Forward: 5'-AAG CTT GTT CTA CCA CCT GAA CTA GGC-3', Reverse: 5'-TTA CAT ATG AGC CTT CCA TG-3' y 0.25 u/µl de Taq Polimerasa Fermentas®. El protocolo de amplificación fue como sigue: 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos (94 °C por 30 s, 56 °C por 35 s, 72 °C por 30 s) y 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa Top Vision TMAI 2.4 % teñidos con Syber Green Invitrogen ® 0.012 %; utilizando como step ladder Gene Ruler TM de 50 -1000 pb Fermentas® (ANEXO 4, Figura 6).

Los productos de PCR fueron digeridos a 37°C durante 4 horas con la enzima de restricción *Nco* / Fermentas®, considerando 15 unidades por 31.5 µl de reacción. Los productos resultantes fueron: 83+16 pb (alelo 1), 99 pb (alelo 2), los que se visualizaron en gel de poliacrilamida 8% usando el Step Ladder Marker, 10 bp- 100 pb Promega® y teñidos con nitrato de plata (ANEXO 4, Figura 6).

6.3. Genotipificación IL-1B C(+3953/4)T

Se utilizó la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar la región promotora del gen de la IL-1B C(+3953/4)T, siguiendo el protocolo descrito en el **ANEXO 5** basados en Balkwill (2000). El volumen final de la reacción fue de 50 µl conteniendo 100 ng de DNA genómico, buffer Taq 10X (NH₄)₂SO₄, 0.8 mM de dNTP mix, 25 mM MgCl₂, 1 µM de cada uno de los primers: Forward: 5'-CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAAA-3', Reverse: 5'-GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG-3 y 2.5 u/µl de Taq Polimerasa Fermentas®. El protocolo de amplificación fue como sigue: 95 °C por 2 min seguido de 35 ciclos (95 °C por 1 min, 67.5 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) y 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa Top Vision TMAI 2.4 % teñidos con Syber Green Invitrogen ® 0.012 %, se usó como ladder Gene Ruler TM de 50 -1000 pb Fermentas® (ANEXO 5, Figura 7).

Los productos de PCR fueron digeridos a 65 °C durante 4 horas con la Enzima de Restricción Taq I Fermentas®, 15 unidades por 31.5 µl de reacción. Los productos resultantes fueron: 85 pb +97 pb +12 pb (alelo1) y 182 pb +12 pb (alelo 2), que fueron visualizados en gel de poliacrilamida 8 % usando como marcador Gene Ruler TM de 50 -1000 pb Fermentas® y teñidos con nitrato de plata (ANEXO 5, Figura 8).

7. Análisis de datos

Los datos de los registros físicos (ficha de recolección de datos y de diagnóstico de periodontitis) fueron ingresados en una hoja de cálculo diseñada para tal fin en el programa Microsoft Excel 2007, con digitación simple. Se generaron las variables de genotipo positivo para IL- 1 A y B, y la del genotipo compuesto.

Para la descripción de variables cualitativas se utilizaron frecuencias absolutas y relativas como medida de tendencia central. Para la descripción de variables cuantitativas se utilizaron el promedio y desviación estándar, como medidas de tendencia central y de dispersión, respectivamente.

Se estudió el Equilibrio de Hardy Weinberg en la población control haciendo uso del test de χ^2 , con un 0.05 de nivel de significación. Para determinar los factores asociados (genéticos y sociodemográficos) se utilizó la regresión logística, empleando un nivel de significancia de 0.05. Se calculó además la razón de probabilidades (OR) con un 95% de Intervalo de Confianza (IC). El χ^2 cuadrado de tendencia lineal se utilizó para determinar la asociación dosis-respuesta entre las variables.

El análisis de datos se realizó empleando el paquete estadístico SPSS versión 17.0 y el programa estadístico *Epi info* 6.04d. Las tablas y los gráficos fueron confeccionados en el programa Microsoft Excel 2007.

RESULTADOS

1. Distribución de factores sociodemográficos en la población de estudio.

En general, la población de estudio fue adulta joven, con un porcentaje de mujeres ligeramente mayor en los controles versus los casos. En relación al nivel de estudio, el 50% de la población tiene estudios primarios desempeñándose como amas de casa en el caso de las mujeres, y obreros en el caso de los hombres. La población de estudio tiene un color de piel predominante trigueño (mestizo). Con respecto al origen, el 50% son de la ciudad de Lima y la procedencia de los padres del centro del Perú. Esta población cuenta con acceso a servicios básicos como agua, desagüe, luz, teléfono. En cuanto a los hábitos de higiene dental, el 50% tiene un frecuencia de lavado de los dientes de 2 a más veces al día; sin embargo el uso de hilo dental y enjuagatorio bucal es poco frecuente en esta población (Tabla 1).

Los sujetos seleccionados en este estudio corresponden a una población homogénea con similares “étnicos/raciales”, nivel socioeconómico, nivel de educación, ocupación, los mismos que evidenciaron un desconocimiento acerca de la periodontitis crónica; sus causas, consecuencias y maneras de prevenirlo; este hallazgo fue respaldado por el hecho de que la enfermedad periodontal no es diagnosticada en los establecimientos cercanos a los lugares donde residen los participantes y por el resultado del cuestionario aplicado.

Tabla 1. Distribución de factores sociodemográficos en casos y controles

CARACTERÍSTICA		CASOS (n=94)	CONTROLES (n=96)
Edad (años)		46 ±13	36 ± 14
Mujeres (%)		42	58
Nivel de Estudio primaria (%)		52	45
Color de Piel trigueño (%)		89	80
Ocupación	Ama de Casa (%)	29	36
	Obrero (%)	39	23
	Independiente (%)	13	15
	Técnico (%)	11	13
	Otros (%)	08	14
Nacidos en Lima (%)		51	48
Viven en Lima Centro (%)		72	72
Servicios Básicos:	Agua (%)	95	97
	Desagüe (%)	99	96
	Luz (%)	99	99
	Teléfono fijo (%)	57	61.3
	Cable (%)	9.3	21.5
	Internet (%)	1.2	0.0
Se lavan los dientes 2 a más veces al día (%)		62	65
Usa hilo dental (%)		2	13
Usa enjuagatorio (%)		9	14

En la población en general (casos y controles) la periodontitis crónica de grado severo fue la de menor frecuencia; la periodontitis crónica es más frecuente en el sexo masculino y según el grupo etario se observa que los casos de periodontitis se incrementan con la edad. La frecuencia de cepillado no parece tener mayor efecto para la manifestación de la periodontitis (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de Periodontitis Crónica según las variables: sexo, grupo etario y frecuencia de cepillado dental.

VARIABLES	CONTROLES	CASOS (%)			
		LEVE	MODERADO	SEVERO	TOTAL
TOTAL (n=188)	50.5	19.7	21.8	8.0	100.0
SEXO					
MASCULINO (n=61)	34.0	18.0	38.0	10.0	100.0
FEMENINO (n=129)	58.0	20.0	15.0	7.0	100.0
GRUPO ETARIO					
18-30 ^a (n=51)	78.4	15.7	3.9	2.0	100.0
31-45 ^a (n=63)	49.2	23.8	19.0	7.9	100.0
46a-más (n=74)	32.4	18.9	36.5	12.2	100.0
CEPILLADO DENTAL					
≥2 VECES AL DÍA (n=116)	51.7	20.7	18.1	9.5	100.0
<2 VECES AL DÍA (n=67)	47.8	19.4	26.9	5.9	100.0

2. Equilibrio de Hardy Weinberg en la población de estudio.

El Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) es una condición necesaria previa a cualquier tipo de estudio genético, para valorar la distribución de frecuencias de los genotipos estudiados; si no hay diferencias significativas entre las frecuencias observadas y las esperadas se dice que la población está en EHW. En el caso de la IL-1A C(-889)T, se encontró una desviación al EHW, puesto que $p < 0.05$ ($p = 0.000$) rechazándose la hipótesis nula (Tabla 3 y 4). Por el contrario, la IL-1B C(+3953/4)T cumple con el EHW (Tabla 5 y 6).

Tabla 3. Frecuencias genotípicas de la IL-1A C(-889)T en la población de controles

GENOTIPO	IL-1A C(-889)T	
	Nº	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS
CC(1,1)	1	1/96 = 0.010
CT(1,2)	94	94/96 = 0.980
TT(2,2)	1	1/96 = 0.010
TOTAL	N=96	1

Las frecuencias alélicas serán:

$$p = D + (1/2) H = 0.010 + (1/2) 0.980 = 0.5 \dots \dots \dots C = 0.5$$

$$q = R + (1/2) H = 0.010 + (1/2) 0,980 = 0.5 \dots \dots \dots T = 0.5$$

Frecuencias esperadas de cada genotipo vienen dadas por:

$$Np^2 \text{ CC, } 2Npq \text{ TC y } Nq^2 \text{ TT}$$

Tabla 4. Cálculo del Chi-cuadrado para determinar el Equilibrio de Hardy-Weinberg para la IL 1-A (-889).

GENOTIPO	IL-1A C(-889)T			
	FRECUENCIAS OBSERVADAS	FRECUENCIAS ESPERADAS	VARIACIÓN (O-E) ²	$\chi^2 = (O-E)^2/E$
CC(1,1)	1	24	189.47	22.04
CT(1,2)	94	48	7575.9616	44.08
TT(2,2)	1	24	1900.09	22.04
TOTAL	N=96			88.17

$$\chi^2 = 88.17; p = 0.000$$

Tabla 5. Frecuencias genotípicas de la IL-1B C(+3953/4)T en la población de controles.

GENOTIPO	IL-1B C(+3953/4)T	
	Nº	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS
CC(1,1)	81	81/96 = 0.844
CT(1,2)	15	15/96 = 0.156
TT(2,2)	0	0/96 = 0.000
TOTAL	N=96	1

Las frecuencias alélicas serán:

$$p = D + (1/2) H = 0.844 + (1/2) 0,156 = 0.5 \dots \dots \dots C = 0.922$$

$$q = R + (1/2) H = 0.000 + (1/2) 0,156 = 0.5 \dots \dots \dots T = 0.078$$

Frecuencias esperadas de cada genotipo vienen dadas por:

$$Np^2 \text{ CC, } 2Npq \text{ TC y } Nq^2 \text{ TT.}$$

Tabla 6. Cálculo del Chi-cuadrado para determinar el Equilibrio de Hardy-Weinberg para la IL-1B C(+3953/4)T.

GENOTIPO	IL-1B C(+3953/4)T			$\chi^2=(O-E)^2/E$
	FRECUENCIAS OBSERVADAS	FRECUENCIAS ESPERADAS	VARIACIÓN (O-E) ²	
CC(1,1)	81	81.6	0.36	0.0044
CT(1,2)	15	13.8	1.44	0.1043
TT(2,2)	0	0.584	0.341	0.584
TOTAL	N=96			0.6894

$$\chi^2 = 0.6894; p = 0.4063$$

3. Características genotípicas de la población de estudio.

El genotipo del polimorfismo de la IL-1A C(-889)T muestra que la frecuencia genotípica predominante, para todas las variables consideradas, fue el heterocigoto 1-2, seguido del homocigoto 2-2 (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia del genotipo IL-1A C(-889)T según las variables: sexo, grupo etario y frecuencia de cepillado dental.

CARACTERÍSTICAS	Genotipo IL-1A C(-889)T			
	1-1	1-2	2-2	TOTAL
TOTAL (n=188)				
SEXO				
MASCULINO (n=61)	1.6	96.7	1.6	100
FEMENINO (n=129)	0.0	95.3	4.7	100
GRUPO ETARIO				
18-30 ^a (n=51)	0.0	100	0.0	100
31-45 ^a (n=63)	1.6	95.2	3.2	100
46a-más (n=74)	0.0	93.2	6.8	100
CEPILLADO DENTAL				
≥2 VECES AL DÍA (n=116)	0.9	95.7	3.4	100
<2 VECES AL DÍA (n=67)	0.0	95.5	4.5	100

Para la IL-1B C(+3953/4)T, la frecuencia genotípica predominante, para todas las variables consideradas, fue el homocigoto 1-1 (Tabla 8).

Tabla 8. Frecuencia del genotipo IL-1B C(+3953/4)T según las variables: sexo, grupo etario y frecuencia de cepillado dental.

CARACTERÍSTICAS	Genotipo IL-1B C(+3953/4)T			
	1-1	1-2	2-2	TOTAL
TOTAL (n=188)				
SEXO				
MASCULINO (n=61)	82.0	9.8	8.2	100
FEMENINO (n=129)	76.7	18.6	4.7	100
GRUPO ETARIO				
18-30 ^a (n=51)	76.5	23.5	0.0	100
31-45 ^a (n=63)	77.8	14.3	7.9	100
46a-más (n=74)	79.7	12.2	8.1	100
CEPILLADO DENTAL				
≥2 VECES AL DÍA (n=116)	82.8	13.8	3.4	100
<2 VECES AL DÍA (n=67)	70.1	19.4	10.4	100

Según los antecedentes bibliográficos, el alelo 2, para ambos polimorfismos, es el que le confiere al individuo mayor riesgo para el desarrollo de la periodontitis crónica, de allí la importancia de generar la variable genotipo positivo (1-2/2-2); cuya frecuencia es alta en el caso de la IL-1A C(-889)T, mas no así en el caso de IL-1B C(+3953/4)T para todas las variables consideradas. Un genotipo positivo se define como aquel que presenta al menos un alelo 2 (T) presente; ya sea en el locus IL-1A C(-889)T o en el locus IL-1B C(+3953/4)T (Tabla 9).

Tabla 9. Frecuencia del genotipo positivo IL-1A C(-889)T e IL-1B C(+3953/4)T* según las variables: sexo, grupo etario y frecuencia de cepillado dental.

CARACTERÍSTICAS	IL-1A C(-889)T			IL-1B C(+3953/4)T		
	+	-	TOTAL	+	-	TOTAL
	(1-2/2-2)	(1-1)		(1-2/2-2)	(1-1)	
TOTAL (n=188)						
SEXO						
MASCULINO (n=61)	98.4	1.6	100	18.0	82.0	100
FEMENINO (n=129)	100	0.0	100	23.3	76.7	100
GRUPO ETARIO						
18-30 ^a (n=51)	100	0	100	23.5	76.5	100
31-45 ^a (n=63)	98.4	1.6	100	22.2	77.8	100
46a-más (n=74)	100	0	100	20.3	79.7	100
CEPILLADO DENTAL						
≥2 VECES AL DÍA (n=116)	99.1	0.9	100	17.2	82.8	100
<2 VECES AL DÍA (n=67)	100	0.0	100	29.9	70.1	100

En relación al genotipo compuesto (IL1A/IL1-B), se observa que lo más frecuente es encontrar por lo menos un alelo 2 considerando ambos polimorfismos a la vez. Un genotipo positivo compuesto se define como aquel genotipo que presenta al menos un alelo 2 (T) presente en cada locus IL-1A C[-889]T / IL-1B C(+3953/4)T (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencia del alelo 2 en el genotipo compuesto (IL1A / IL1-B) según las variables: sexo, grupo etario y frecuencia de cepillado dental

VARIABLES	N° de alelos 2 Genotipo (IL1A / IL1-B) *					TOTAL
	0	1	2	3	4	
TOTAL (n=188)						
SEXO						
MASCULINO (n=61)	0.0	82.0	9.8	8.2	0.0	100
FEMENINO (n=129)	0.0	72.9	21.7	5.4	0.0	100
GRUPO ETARIO						
18-30 ^a (n=51)	0.0	76.5	23.5	0.0	0.0	100
31-45 ^a (n=63)	0.0	77.8	12.7	9.5	0.0	100
46a-más (n=74)	0.0	73.0	18.9	8.1	0.0	100
CEPILLADO DENTAL						
≥2 VECES AL DÍA (n=116)	0.0	80.2	16.4	3.4	0.0	100
<2 VECES AL DÍA (n=67)	0.0	67.2	20.9	11.9	0.0	100

* 0=(1-1)/ (1-1), 1=(1-2)/(1-1), 2=(1-2)/ (1-2), 3=(1-2)/ (2-2), 4=(2-2)/ (2-2).

Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T en los casos y controles, muestra que el genotipo 1-2 de la IL-1A C(-889)T supera el 90% tanto en casos y controles; mientras que los casos presentan mayor frecuencia del genotipo 2-2 (6.4%) que los controles (1%). En el caso de la IL-1B C(+3953/4)T, es más frecuente el genotipo 1-1 seguido del genotipo 1-2 y 2-2, tanto en casos como en controles; sin embargo la frecuencia del genotipo 2-2 es mayor en los casos (11.7%) que en los controles (0.0%) (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución del genotipo de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T en casos y controles en la población de estudio.

GENOTIPO	CASOS (N=94)		CONTROLES (N=96)	
	N	%	N	%
IL-1A C(-889)T				
1-1	0	0.0	1	1.0
1-2	88	93.6	94	97.9
2-2	6	6.4	1	1.0
IL-1B C(+3953/4)T				
1-1	68	72.3	81	84.4
1-2	15	16.0	15	15.6
2-2	11	11.7	0	0.0

4. Asociación de los polimorfismo de la IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica.

Se encuentra una asociación positiva; es decir la presencia del genotipo positivo del polimorfismo IL-1B C(+3953/4)T se asocia con el desarrollo de la periodontitis crónica; por lo que se le considera un factor de riesgo. El riesgo de desarrollar periodontitis crónica es dos veces más probable con el genotipo positivo de la IL-1B C(+3953/4)T en relación al genotipo negativo del mismo polimorfismo, siendo esta asociación estadísticamente significativa (OR: 2.065, 95%, IC:1.012-4.210, p=0.044). Al traducir el valor del OR a probabilidad se obtiene 67.4%, que significa que existe un 67.4 % de probabilidad para el

desarrollo de la periodontitis crónica, cuando el genotipo de la IL-1B C(+3953/4)T es positivo (Tabla 12).

Tabla 12. Asociación del genotipo positivo de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica en la población de estudio.

GENOTIPO	CASOS (N=94)		CONTROLES (N=96)	
	N	%	N	%
IL-1A C(-889)T				
(1-1)	0	0	1	1.0
(1-2)/(2-2)	94	100.0	95	98.9
IL-1B C(+3953/4)T *				
(1-1)	68	72.3	81	84.4
(1-2)/(2-2)	26*	27.7	15	15.6

* $\chi^2=4.065$; $p=0.044$; OR= 2.065 (IC: 1.012 – 4.210)

5. Asociación y asociación dosis - respuesta (tendencia) del genotipo compuesto de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica en la población de estudio

En relación a la asociación dosis - respuesta (tendencia) del genotipo compuesto de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica; se observa que el genotipo compuesto con ≥ 2 alelos (genotipo compuesto positivo), se asocia con el desarrollo de la periodontitis crónica; por lo que la presencia del alelo 2 en el genotipo compuesto se considera un factor de riesgo para el desarrollo de periodontitis crónica. El riesgo de desarrollar periodontitis crónica es de tres veces más probable en el genotipo compuesto positivo en relación al genotipo compuesto que no presenta el alelo 2 y es estadísticamente significativa (OR: 3.023, 95%, IC: 1.487- 6.145, $p=0.002$,). Al traducir el valor del OR a probabilidad se obtiene 75.14%, que significa que existe un 75.14% de probabilidad para el desarrollo de la periodontitis crónica, cuando genotipo compuesto tiene ≥ 2 alelos.

El genotipo compuesto (1-1/ 1-2), no evidencia asociación entre las variables (OR(1-1/ 1-2):1.00); sin embargo el genotipo compuesto (1-1/ 2-2), muestra una asociación positiva para el desarrollo de la periodontitis crónica, siendo esta 2 veces más probable, en relación al genotipo compuesto sin presencia del alelo 2 (OR: 2.14, 95%, (IC 0.859-3.927)), y si el genotipo compuesto muestra tres alelos 2 (1-2 /2-2) la asociación positiva se hace más evidente, donde el riesgo para desarrollar periodontitis crónica es 15 veces más probable frente al genotipo compuesto sin el alelo 2 (OR: 14.55, 95%, (IC 1.592 - 99.596). Al traducir los valores del OR a probabilidades se observa que según el número de alelos 2 presentes, la probabilidad de desarrollar periodontitis crónica con el genotipo compuesto positivo se incrementa desde el 50%, 68.2% hasta el 93.6%) (Tabla 13).

Tabla 13. Asociación y asociación dosis – respuesta del genotipo compuesto de IL-1A C(-889)T y IL-1B C(+3953/4)T con la periodontitis crónica en la población de estudio.

GENOTIPO COMPUESTO	CASOS (N=94)		CONTROLES (N=96)	
	N	%	N	%
1-1/ 1-2	62	43.1	82	56.8
1-1/ 2-2	21	61.8	13	38.2
1-2 /2-2	11	91.7	1	8.3

$\chi^2=12.667$; $p=0.000$; OR=3.023 (IC: 1.487 – 6.145)

OR (1-1/ 1-2) =1.00,

OR (1-1/ 2-2) =2.14 (IC 0.859 - 3.927)

OR (1-2 /2-2) =14.55 (IC 1.592 - 99.596).

6. Determinar la asociación y asociación dosis - respuesta (tendencia) entre el genotipo de IL1 y factores sociodemográficos con la periodontitis crónica en la población de estudio

Con respecto a la edad y el desarrollo de la periodontitis crónica; se observa que el grupo etario de 18-30 años, no evidencia asociación entre las variables (OR (18-30):1.00); sin embargo el grupo etario de 31- 45 años, muestra una asociación positiva para el desarrollo de la periodontitis crónica, siendo esta de 3.75 veces más probable en relación con los otros grupos de edad (OR (31-45):3.75; 95%, IC (0.591–1.985)), y si la edad es mayor a los 46 años la asociación positiva se hace más evidente, donde el riesgo para desarrollar periodontitis crónica es 7.50 veces más probable frente a los otros grupos de edad y es estadísticamente significativa (OR (46-más): 7.50, 95%, IC (1.857-6.374)). Al traducir el valor del OR a probabilidades se observa que según se incrementan los años de las personas la probabilidad de desarrollar periodontitis crónica también se incrementa desde el 50% hasta el 88.2% (Tabla 14).

Tabla 14. Asociación de tendencia de la variable grupo etario con la periodontitis crónica en la población de estudio.

Variable	CASOS (N=94)		CONTROLES (N=96)	
	N	%	N	%
EDAD				
18-30a	11	21.6	40	78.4
31-45a	31	50.8	31	49.2
46a a más	50	67.6	24	32.4

$\chi^2=24.848$; $p=0.0000$

OR (18-30) =1.00;

OR (31-45) =3.75; IC (0.591 – 1.985)

OR (46-más) =7.50; IC (1.857 – 6.374)

Con respecto al nivel de estudios y el desarrollo de la periodontitis crónica; se observa una tendencia a disminuir el riesgo a desarrollar periodontitis crónica cuando es mayor el nivel de estudios adquiridos por los participantes; así cuando el nivel de estudios es de primaria o analfabeto no se evidencia asociación entre las variables (OR (primaria a menos) =1.00); sin embargo cuando el nivel de estudios es secundario, muestra una asociación negativa para el desarrollo de la

periodontitis crónica, siendo esta de 0.75 veces más probable de desarrollar la enfermedad en relación al con los otros grados de instrucción (OR(secundaria): 0.75, 95%, IC: (0.725–2.356)), y si el nivel de estudios es superior, la asociación negativa se hace más evidente, donde el riesgo para desarrollar periodontitis crónica es 0.43 veces más probable frente a los otros grupos de nivel de estudio y es estadísticamente significativa (OR(superior): 0.43, 95%, IC: 0.278–0.989). Al traducir el valor del OR a probabilidad se obtiene 30.1%, que significa que existe un 30.1 % de probabilidad para el desarrollo de la periodontitis crónica, cuando el nivel de estudios es superior (Tabla 15).

Tabla 15. Asociación de tendencia de la variable grado de instrucción con la periodontitis crónica en la población de estudio.

VARIABLE		CASOS (N=94)		CONTROLES (N=96)	
GRADO DE INSTRUCCIÓN	N	%		N	%
Primaria a menos	19	59.4		13	40.6
Secundario	45	52.3		41	47.7
Superior	23	38.3		37	61.7

$$\chi^2=4.262; p=0.03898$$

OR (primaria a menos) =1.00;

OR (secundaria) =0.75; IC:(0.725 – 2.356)

OR (superior) =0.43 IC: (0.278 – 0.989)

DISCUSIÓN

Población de Estudio y el Equilibrio de Hardy Weinberg

Los resultados encontrados, en relación al grupo etario y el grado de instrucción; y el desarrollo de la enfermedad periodontal concuerdan con las estadísticas mundiales que indican que la periodontitis crónica es la enfermedad inflamatoria más frecuente en todo el mundo, que afecta casi el 50% de la población adulta y al 60% de la población anciana a nivel mundial (Weam Banjar & Muteb H Alshammari, 2014) y que esta estrechamente relacionada con la pobreza y el grado de instrucción.

Las interacciones entre los genes y el ambiente se pueden manifestar de diferentes maneras, bien por el riesgo basado en el genotipo de cada individuo, o por riesgo originado por la exposición al ambiente de esos genes polimórficos (Lannuzzi *et al.*, 2002). Es sabido que la distribución de la frecuencia de los polimorfismos varía según el componente étnico de cada población humana y es esto lo que explicaría, en parte, la mayor predisposición de algunas poblaciones a ciertas enfermedades; por ejemplo, varios investigadores han mostrado en diferentes grupos étnicos, una fuerte asociación entre los polimorfismos pro-inflamatorios de la IL-1 y la enfermedad periodontal; sin embargo otros muestran que no existe tal asociación (Deng *et al.*, 2013; Nikolopoulos *et al.*, 2008); probablemente debido a la diversidad en el componente genético de las poblaciones humanas. El estudio realizado por Moran *et al.* (2009) sobre los polimorfismos de IL-1 (IL-1B-511, IL-1B+3954 e IL-1RN) en una muestra de la población de la región centro occidental de Venezuela, evidencia diferencias significativas en la distribución de los polimorfismos IL-1 de esta población con las del resto del mundo.

Mientras que los efectos sinérgicos potenciales de los polimorfismos de los genes de las citoquinas sobre la patogénesis de la enfermedad aún no se han establecido plenamente, la etnicidad claramente muestra que está asociada con las diferencias dramáticas en la distribución de los polimorfismos de las citoquinas (Hoffmann *et al.*, 2002), que podrían resultar en una variación individual en la

regulación transcripcional y por ende en la producción diferencial de citoquinas (Parmeet., *et al* 2005), haciendo posible que diferencias entre las poblaciones o grupos étnicos refleje un perfil único que pudiera afectar la predisposición a la enfermedad periodontal y su prevalencia.

El hecho de que el proceso de colonización haya sido diferente en los países de Latinoamérica y por ende la confluencia de diferentes grupos étnicos, ha generado la existencia de una gran heterogeneidad genética; es decir que las frecuencias alélicas en las poblaciones mixtas de América varían en relación con la contribución parental. El Perú es una nación multiétnica formada en su mayoría por indígenas y mestizos (85%), 12% de ascendencia española, 2% de ascendencia africana y una minoría asiática (Hazalgomás, 2011). Los datos de identificación étnica del INEI indican que el 57.6% de la población peruana se identifica como mestiza, 22.5% como quechuas, 4.8% como blancas, 2.7% como aymaras, 1.7% como de la amazonía y 9.1% señaló categorías diferentes a las mencionadas o no sabe (Dirección Técnica de Demografía e Indicadores Sociales, 2007). Aun así, esta clasificación pierde valor por el hecho de que es la persona la que reconoce su identidad étnica cultural y que no existen “marcadores” objetivos que definan etnia o raza. Por tal motivo, y de acuerdo con Valdivia (2011), consideramos que la categoría “raza” no puede ayudar a identificar grupos poblacionales por no ser objetiva, inmutable e invariable.

Es creciente el número de estudios de asociación entre las variantes de secuencias de ADN y determinadas enfermedades, así como la gran utilidad de los diseños de casos y controles; sin embargo es frecuente la falta de reproducibilidad entre los diferentes estudios, debido a sesgos producidos por la mala elección de casos y controles, la elección de marcadores genéticos y errores de genotipificación (Llorca *et al.*, 2005; Cacheiro, 2011; Soriguer & Morcillo, 2007). El EHW tal vez es el procedimiento más común de control de calidad en genética humana pues, hace referencia a la independencia de alelos en un locus entre cromosomas homólogos. Las desviaciones de este equilibrio pueden ser indicativos de errores de genotipado o mostrar factores que podrían afectar a las frecuencias alélicas como por ejemplo una migración reciente (Cacheiro, 2011).

Existen múltiples explicaciones de la desviación al EHW, del polimorfismo IL-1A C(-889)T, como las que expone Soriguer & Morcillo (2007): 1) los alelos del gen de la IL-1A C(-889)T no segregan de forma independiente, 2) que los alelos reflejen una mutación reciente que aún no ha alcanzado el equilibrio, 3) errores de genotipificación, 4) sesgos en la selección de los sujetos controles, 5) la existencia de una estratificación de la población. Las frecuencias genóticas del polimorfismo IL-1A C(-889)T encontradas en este estudio se alejan bastante de otras investigaciones realizadas en distintas partes del mundo; estas discordancias con otros estudios y el desequilibrio con la ley puede deberse al tamaño de la muestra y a la diversidad étnica del País.

Es importante señalar que incluso si la población general está en EHW, la distribución genotípica del marcador que se espera este asociado al riesgo de tener determinada enfermedad puede estar desviada del EHW cuando la asociación es realmente cierta (Soriguer & Morcillo, 2007), es debido a esto que *Strengthening the Reporting of Genetic Association studies* (STRTEGA) reconoce que la prueba para EHW es una herramienta cuestionable para detectar errores de genotipificación, por el supuesto subyacente de que EHW rara vez se cumple en poblaciones humanas (Shoemaker *et al.*, 1998; Souren & Zeegers, 2011)

IL-1A C(-889)T

En nuestro estudio encontramos que el genotipo más frecuente fue el heterocigoto 1-2, tanto en casos (94%) como en controles (98%) (Tabla 11); sin embargo varios estudios han reportado que el genotipo más frecuente del gen de IL-1A en el sitio C(-889)T fue el homocigoto para el alelo1 y que este fue más frecuente en los controles que en los casos (Laine *et al.*, 2001; López *et al.*, 2005; Mao *et al.*, 2013).

La frecuencia del alelo 2 en el gen de la IL-1A, en este estudio fue del 50%, otros estudios muestran una frecuencia del alelo 2 de 41,76% (López *et al.*, 2005); en poblaciones alemanas, suecas y brasileñas las tasas son de 50.3%, 40,6%, 52.0% y 56.4% respectivamente (Trevilatto *et al.*, 2011). Tanto en el presente estudio como en otros (López *et al.*, 2005) muestran una baja frecuencia

del genotipo homocigoto para el alelo 2, frecuencia de 1.39% (López *et al.*, 2005); en este estudio la frecuencia fue de 1.01% (Tabla 11); otros estudios en poblaciones caucásicas reportaron tasas que van desde el 4.4 % al 18 %, (López *et al.*, 2005), evidenciando que estas frecuencias varían mucho entre poblaciones étnicamente distintas, así por ejemplo en africanos y americanos esta frecuencia es de 1.41% en chinos es de 0.66% y en japoneses no se encuentran.

Este estudio no ha encontrado asociación entre el genotipo positivo del gen de la IL-1A y el desarrollo de la periodontitis crónica, lo mismo se reporta en estudios realizados en otras poblaciones de origen caucásico y japonés (Wang *et al.*, 2014); sin embargo existen otros estudios que sí reportan asociación entre la periodontitis crónica y el gen de la IL1-A (Mao *et al.*, 2013). Un metanálisis evaluó descendientes caucásicos y asiáticos y reportó asociación para el riesgo relativo del alelo 2 y la periodontitis crónica (OR:1.310, 95%, IC: 0.959 -1.789); sin embargo esta no fue significativa, pero cuando analizó solo al subgrupo de sujetos caucásicos encontró una asociación estadísticamente significativa (OR: 1.664, IC: 1.269 - 2.181) (Nikolopoulos *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2013). Estas diferencias en los resultados refuerza la idea de la existencia de un factor de “etnicidad” que podrían hacer, que las frecuencias derivadas de un grupo poblacional no sean predictores confiables de la enfermedad periodontal para otro grupo (Baker & Roopenian, 2002).

IL-1B C(+3953/4)T

La frecuencia genotípica, para el gen IL-1B, predominante en nuestro estudio fue el homocigoto para el alelo 1 (72.3% los casos y 84.4% los controles), (Tabla 11), estas tasas son muy parecidas a las encontradas por López *et al.* (2005), 70.30% en los casos y 87.12% en los controles, para la población chilena.

La frecuencia del alelo 2 en el gen de la IL-1B fue de 7.8%; en relación a la frecuencia del homocigoto para el alelo 2, este fue de 11.7% para los casos y de 0% para los controles (Tabla 11). López *et al.* (2005) reportan un 2.12 % en los casos y un 1.98% en los controles para la población chilena; en el caso de la población japonesa no se encontraron homocigotos para el alelo 2.

La asociación del alelo 2 de IL-1B con la periodontitis crónica, encontrado en el presente estudio está de acuerdo con lo informado por otros autores (Nikolopoulos *et al.*, 2008; López *et al.*, 2005; Baker & Roopenian, 2002; Deng *et al.*, 2013; Trevilatto *et al.*, 2011). Walker *et al.* (2000) estudiaron una población afro-estadounidense e informaron que la prevalencia del genotipo positivo fue del 14% en un grupo de control y 8% en casos de periodontitis agresiva. López *et al.* (2005), para una población chilena, informa una prevalencia del genotipo positivo fue de 26.06% para los casos y de 9.90 % para los controles; en nuestro caso esta prevalencia fue de 27.7% para los casos y de 15.6% para los controles (Tabla 12).

Según nuestro estudio los portadores del genotipo positivo muestran una asociación significativa con la periodontitis crónica (OR: 2.065, 95%, IC: 1.012 - 4.210, $p=0.001$) esta asociación es ligeramente inferior a la encontrada por Lopez *et al.* (2005) (OR: 3.21, 95%, IC: 1.60 - 6.44, $p = 0.001$). Por otro lado el metanálisis de Nikolopoulos *et al.* (2008), basado en veintitrés artículos, ha encontrado un riesgo estadísticamente significativo para el desarrollo de la periodontitis crónica (OR: 1.447, 95%, IC: 1.129-1.854) cuando el genotipo es positivo. Baldini *et al.* (2013), también encontraron que el polimorfismo del gen IL-1B C(+3953/4)T se asocia significativamente con la periodontitis crónica y que los portadores del alelo 2 (T) incrementan el riesgo a desarrollar periodontitis crónica. Otro meta-análisis ejecutado por Deng *et al.* (2013) respaldan la asociación significativa entre el polimorfismo del gen IL-1B C(+3953/4)T y la periodontitis crónica; siendo para el alelo 2 *versus* el alelo 1 (OR: 1.30, 95%, IC: 1.05–1.60, $p=0.02$), para el genotipo 2-2 *versus* 1-1 (OR: 1.66, 95%, IC: 1.12-2.45, $p=0.01$), para el genotipo 2-2/1-2 *versus* 1-1 (OR:1.28, 95%, IC:0.99– 1.65) y para el genotipo 2-2 *versus* 1-2/1-1 (OR: 1.62, 95%, IC:1.15–2.29, $p = 0.006$).

Las diferencias de los OR en los resultados presentados en las diferentes investigaciones se atribuyen a un factor “étnico”. Cuando las poblaciones son estratificadas por etnicidad se observa un riesgo más elevado para la población de origen caucásico pero no para los asiáticos (Deng *et al.*, 2013)

Si bien las frecuencias genotípicas encontradas en el gen de la IL-1A C(-889)T no se corresponden con las encontradas en la mayoría de los estudios, las frecuencias alélicas si se han reportado en la mayoría de los estudios; por lo que se creyó conveniente realizar el análisis del genotipo compuesto.

En relación a la presencia del alelo 2 en el genotipo compuesto, se observa que existe asociación significativa entre la periodontitis crónica y el genotipo compuesto positivo (OR: 3.023, 95%, IC: 1.487 – 6.145) y que esta asociación es mayor cuando mayor es el número de alelos 2 presentes en el genotipo compuesto (Tabla 13). Esta asociación también fue encontrada por otros estudios (Ferro & Gómez, 2007; Nikolopoulos *et al.*, 2008; López *et al.*, 2005; Agrawal *et al.*, 2006). Según Nikolopoulos *et al.* (2008); refiriéndose a los criterios de Hill de causalidad, sobre efecto dosis-respuesta encontrado también en su meta-análisis; dice que este efecto es una fuerte indicación de una verdadera relación etiológica.

El meta-análisis de Deng *et al.*, 2013, estratificó los artículos por diseño en estudios basados en poblaciones y estudios basados en hospitales y observó para ambos asociación significativa entre el polimorfismo del gen IL-1B C(+3953/4)T y la periodontitis crónica; esto indicaría que pese a existir sesgos de selección, la asociación es tan evidente que se manifiesta.

Los mecanismos moleculares

Los argumentos que refuerzan la asociación entre los polimorfismos de IL-1 y la enfermedad periodontal, se encuentran en el hecho de que tanto la IL-1 α como la IL-1 β tienen propiedades pro-inflamatorias y se encuentran en concentraciones altas en tejidos periodontales enfermos (Rivera *et al.*, 2007; Vélez-Castrillón *et al.*, 2004), además los polimorfismos de los genes de la IL-1 tienen un rol funcional directo en la transcripción de los genes y la producción de proteínas y están relacionadas con otras enfermedades complejas (Nikolopoulos *et al.*, 2008). Detrás de la asociación entre el genotipo positivo y la enfermedad periodontal existe la hipótesis de que estos polimorfismos puedan modular la secreción de la IL-1, esta relación viene siendo demostrada en múltiples artículos

(Agrawal *et al.*, 2006; Baker & Roopenian, 2002; Trevilatto *et al.*, 2011); tal es así, que en el caso del alelo 2 de IL-1A C(-889)T se encontró fuerte evidencia de su asociación con el aumento de casi 4 veces de los niveles de la IL-1 α (López *et al.*, 2005), esto podría deberse a que el polimorfismo de la IL-1A (-889) localizada en la región promotora, si bien no afecta la secuencia de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas, si podría influir en la producción de la proteína a nivel transcripcional y post-transcripcional.

Por el contrario el polimorfismo de la IL-1B (+3953/4), se encuentra localizado en el exón 5 de la región codificante del gen de la IL-1B, y representa una sustitución conservativa; por lo que no es claro como este polimorfismo podría afectar la transcripción del gen. Sin embargo, se han observado niveles elevados de IL-1 β en el fluido crevicular gingival en pacientes portadores del genotipo positivo (Valderrama *et al.*, 2005 & Ferreira *et al.*, 2008); *in vitro*, la presencia del alelo 2 en el polimorfismo IL-1B (+3953/4) de células sanguíneas polimorfonucleares, estimuladas con lipopolisacaridos (LPS) muestra un incremento en la producción de la IL-1 β y un efecto dosis alelo (Laurincová, 2000); así mismo Baldini *et al.* (2013) y Rivera *et al.* (2007) asocia este incremento con el aumento de la potencia de la resorción ósea y la destrucción del tejido conectivo; y finalmente, el resultado obtenido en este estudio y otros muchos, que evidencia una asociación entre el genotipo positivo del polimorfismo IL-1B (+3953/4) y la enfermedad periodontal. Todas estas relaciones podrían encontrarse explicados por un lado, por la existencia de un efecto cooperativo entre los polimorfismos IL-1B (+3953/4), IL-1B (-511) y el polimorfismo VNTR de la IL-1Ra como lo describe Laurincová (2000) y por otro por a la existencia de un desequilibrio de ligamento genético con polimorfismos de la región regulatoria del gen de la IL-1B. Un estudio ha demostrado desequilibrio de ligamento genético entre IL-1B (-511) and (+3953/4), delta = 0.44 (Bazrafshani., *et al* 2002).

La IL-1 β es una proteína que induce su propia expresión *in vitro*, esta autoinducción puede ser inhibida por la IL-1Ra. La inhibición fisiológica de la IL-1 por la IL-1Ra al parecer protege al organismo de reacciones exageradas del organismo frente a las infecciones puesto que la afinidad por el receptor tipo I (IL-

1RI) es mayor $IL-1Ra > IL-1\alpha > IL-1\beta$, mientras que para receptor tipo II (IL-1RII) la afinidad es $IL-1\beta > IL-1\alpha > IL-1Ra$ (Laurincová, 2000). Es sabido de que la unión de la $IL-1\alpha$ o $IL-1\beta$ al receptor tipo I (IL-1RI), es responsable de la señalización específica y en consecuencia estimulación celular, en cambio el receptor tipo II (IL-1RII), funciona como un receptor señuelo que no causa estimulación celular.

In vitro en células mononucleares estimuladas por LPS, el alelo 2 del polimorfismo de la IL-1Ra (IL-1RN*2) produce una sobre regulación de la IL-1 β y IL-1Ra. El polimorfismo IL-1B (+3953/4) y (-511), también participan en la regulación de la IL-1Ra y muestran un efecto cooperativo; tal es así que *in vivo* el fenotipo IL-1RN*2 incrementa los niveles de IL-1Ra en una población saludable solo en presencia del alelo 2 de la IL-1B -511. El alelo 2 de la IL-1B (-511) y IL-1RN*2 representan un fenotipo “alta secreción” pues conducen al incremento de la actividad proinflamatoria en enfermedades infecciosas o autoinmunes. Más que la cantidad absoluta de IL-1 β o IL-1Ra, la relación IL-1 β / IL-1Ra es determinante en la respuesta inflamatoria. (Laurincová, 2000). El portador del alelo 2 IL-1B (-511) o el portador del alelo 2 del IL-1B (+3953/4) han sido asociados con una mayor producción de IL-1 β (Bazrafshani., *et al* 2002).

En este estudio no se ha evaluado el polimorfismo de la región promotora de la IL-1B (-511) ni el polimorfismo VNTR de la IL-1Ra. Al existir evidencia de la interrelación de estos polimorfismos con el polimorfismo IL-1B (+3953/4); es posible que la presencia del alelo 2 en cualquiera de estos polimorfismos o en ambos este favoreciendo la asociación del el genotipo positivo de la IL-1B (+3953/4) con la enfermedad periodontal; sin embargo son necesarios mayores estudios que relacionen los genotipos de los tres polimorfismos (desequilibrio de ligamneto genético entre los SNPs) y los niveles de IL-1 β en el fluido cervical gingival con la enfermedad periodontal, para poder determinar cómo las interacciones de estos polimorfismos influye en el desarrollo de la enfermedad periodontal y las diferencias encontradas en los diferentes grupos étnicos o poblacionales.

En este estudio, se ha encontrado asociación entre la enfermedad periodontal y IL-1B (+3953/4) pero no con la IL1- A (-889). Como lo explicara Bazrafshani *et al* (2002), esto se debería a que se ha identificado 1) que se transcribe más IL-1B que IL-1 A en neutrófilos estimulados por LPS (Lord., *et al* 1991); 2) que los polimorfismos de IL1-B son más importantes para determinar el riesgo de desarrollo temprano de la periodontitis que la IL1-A (Diehl *et al.*, 1999); y 3) se ha encontrado que la distribución de los receptores de la IL-1 (IL-1R1 y IL-1R2) no son los mismos en los diferentes tejidos orales por lo tanto, la afinidad de IL-1 α and IL-1 β por estos receptores y la distribución de estos en el tejido oral explicaría la asociación entre el polimorfismo e la IL-1B pero no de la IL-1A con la periodontitis (Dale & Nicklin, 1999).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio apoyan fuertemente la asociación entre la variación del polimorfismo genético de la IL-1B C(+3953/4)T y la periodontitis crónica; esta asociación coincide con las encontradas en poblaciones caucásicas, asiáticas y chilenas. El portador del genotipo positivo tiene un 67.4% de probabilidad de riesgo para el desarrollo de la periodontitis crónica; el portador del genotipo compuesto positivo en general tiene un 75.14% de probabilidad de riesgo para el desarrollo de la periodontitis crónica; si el genotipo compuesto es del tipo (1-1/ 2-2) la probabilidad es del 68.2% y si el genotipo es (1-2 /2-2) la probabilidad se incrementa al 93.6%. El genotipo compuesto ((2-2 /2-2) no se ha encontrado en la población de estudio.

RECOMENDACIONES

Se sugiere, estudiar los polimorfismos en la IL-1B +3953/4 , IL-1B -511 y IL-1RN*2 y su asociación con la enfermedad periodontal, *in vitro* e *in vivo*, en la población peruana.

LIMITACIONES

El número de sujetos incluidos es limitado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A., KAPLEY, A., YELTIWAR, R. K., & PUROHIT, H. J. (2006). Assessment of single nucleotide polymorphism at IL-1A+4845 and IL-1B+3954 as genetic susceptibility test for chronic periodontitis in Maharashtrian ethnicity. *Journal of Periodontology*, 77(9), 1515–21.

AGUEDA, A., RAMÓN, J. M., MANAU, C., GUERRERO, A., & ECHEVERRÍA, J. (2008). Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol*, 35, 16–22.

BAKER, P. J., & ROOPENIAN, D. C. (2002). Genetic susceptibility to chronic periodontal disease. *Microbes and Infection*, 4(11), 1157–1167.

BALDINI, A., NOTA, A., FANTI, E., MARTELLI, F. S., OTTOMANO, C., & LIPPI, G. (2013). Association between periodontal disease and Interleukin-1 β +3953 and vitamin D receptor Taq1 genetic polymorphisms in an Italian caucasian population. *Annali Di Stomatologia*, 4(2), 191–5.

BALKWILL, F. (2000). *Cytokine Molecular Biology A Practical Approach* (Third edit). New York- U.S: Oxford University Press.

BAZRAFSHANI, M.R., HAJEER, A H., OLLIER, W.E.R., & THORNHILL, M.H. (2002). IL-1B and IL-6 gene polymorphisms encode significant risk for the development of recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Genes and Immunity*, 3(5), 302–5.

BECK, J.D., PANKOW, J., TAYROLER, H.A., & OFFENBACHER, S. (1999). Dental infections and atherosclerosis. *Am Heart J*, 138, 528–533.

CACHEIRO MARTÍNEZ, P. (2011). *Métodos de selección de variables en estudios de asociación genética . Aplicación a un estudio de genes candidatos en Enfermedad de Parkinson*. Universidad de Santiago de Compostela.

CAIRO, F., CASTELLANI, S., GORI, A.M., NIERI, M., BALDELLI, G., & ABBATE (2008). Severe periodontitis in young adults is associated with sub-clinical atherosclerosis. *J Clin Periodontol*, 35(6), 465–472.

CANAKCI V, CANAKCI CF, YILDIRIM A, INGEC M, ELTAS A, & ERTURK A. (2007). Periodontal disease increases the risk of severe pre-eclampsia among pregnant women. *J Clin Periodontol*, 34, 639–645.

CASTRILLÓN RIVERA, E.L., MACÍN CABRERA, A.S., & PALMA RAMOS, A. (2007). Participación de la interleucina 1 β (IL-1 β) en periodontitis. *Revista Odontológica Mexicana*, 11(4), 185–200.

CUMBAL GUERRÓN, N. I. (2010). *Estudio de los Polimorfismos en las regiones -31(T>C), -511(C>T) Y +3954(C>T) del gen IL-1 β de Interleuquina-1 β Mediante PCR-RFLP en población Ecuatoriana con Cáncer Gástrico y presencia de Helicobacter pylori*. Escuela Politécnica del Ejército.

DALE, M., & NICKLIN, M. J. (1999). Interleukin-1 receptor cluster: gene organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2 (IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q. *Genomics*, 57(1), 177–9.

DENG, J.S., QIN, P., LI, X.-X., & DU, Y.H. (2013). Association between interleukin-1 β C (3953/4)T polymorphism and chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis. *Human Immunology*, 74(3), 371–8.

DESTEFANO, F., ANDA, R., KAHN, H., WILLIAMSON, D., & RUSSELL, C. (1993). Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 306(6879), 688–91.

DIEHL, S.R., WANG, Y., BROOKS, C.N., BURMEISTER, J.A., CALIFANO, J.V, WANG, S., & SCHENKEIN, H.A. (1999). Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology*, 70(4), 418–30.

DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA, & MINISTERIO DE SALUD. (2009). Determinantes de riesgo en salud bucal. *Boletín Epidemiológico N°13*, 18(13), 243–244.

DIRECCIÓN TÉCNICA DE DEMOGRAFÍA E INDICADORES SOCIALES. (2007). *Estado de la población peruana. Indocumentación y Grupos Étnicos 2007*. Lima: Instituto Nacional de Estadística e Informática.

FERREIRA, S.B., TROMBONE, A.P. F., REPEKE, C.E., CARDOSO, C.R., MARTINS, W., SANTOS, C.F., & GARLET, G.P. (2008). An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infection and Immunity*, 76(8), 3725–34.

FERRO CAMARGO MB, & GÓMEZ GUZMÁN M. (2007). *Periodoncia Fundamentos de la Odontología*. (Universidad Pontificia, Ed.). Bogotá: Javeriana.

GARCÍA ZAVALITA, C., & MAGIÑA ALARCÓN, E. (2008). Salud Bucal del Adulto. Revisión para profesionales del Equipo de Atención Primaria. *MPA E- Journal Med. Fam. & At. Prim. Int*, 2(1), 31–37.

GEMMELL, E., & MARSHALL, R. (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 14, 112–43.

GOMES-FILHO, I.S., CRUZ, S.S., REZENDE, E. J.C., DOS SANTOS, C.A., SOLEDADE, K. R., MAGALHÃES, M. A., & CERQUEIRA E. (2007). Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol*, 34(11), 957–963.

HAZALGOMÁS. (2011). Evolución y Situación Actual en la República del Perú. Madrid- España.

HOFFMANN, S. C., STANLEY, E. M., COX, E. D., DIMERCURIO, B. S., KOZIOL, D.E., HARLAN, D.M., & BLAIR, P.J. (2002). Ethnicity Greatly Influences Cytokine Gene Polymorphism Distribution. *American Journal of Transplantation*, 2(6), 560–567.

IANNUZZI, M. C., MALIARIK, M., & RYBICKI, B. (2002). Genetic polymorphisms in lung disease: bandwagon or breakthrough? *Respiratory Research*, 3, 15.

JEFFCOAT, M., HAUTH, J., GEURS, N., REDDY, M., CLIVER, S., HODGKINS, P., & GOLDENBERG, R. (2003). Periodontal disease and preterm birth: results of a pilot intervention study. *Journal of Periodontology*, 74, 1214–1218.

KJELDSEN, M., HOLMSTRUP, P., LINDEMANN, R., & BENDTZEN, K. (1995). Bacterial–stimulated cytokine production of peripheral mononuclear cells from patients of various periodontitis categories. *Journal of Periodontology*, 66, 139–144.

LAINE M.L, FARRÉ M.A, & GARCÍA-GONZALEZ M.A,. (2001). Polymorphisms of the interleukin-1 gene family, oral microbial pathogens, and smoking in adult periodontitis. *J Dent Res*, 80(1695-1699).

LALLA, E., LAMSTER, I.B., HOFMANN, M.A., BUCCIARELLI, L., JERUD, A.P., TUCKER, S., & SCHMIDT, A.M. (2003). Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(8), 1405–11.

LAURINCOVÁ, B. (2000). Interleukin-1 Family : From Genes To Human Disease. *Acta Univ. Palacki. Olomuc.*, 143, 19–30.

LIZARRAGA MARROQUIN, C.A., & PROAÑO DE CASALINO, D. (2005). La enfermedad periodontal como factor de riesgo de parto pretérmino y de bajo peso al nacer en el Hospital Nacional Cayetano Heredia. *Revista Medica Herediana*,

16(3), 172–177.

LLORCA, J., ONOFRE, P., DIERSSEN-SOTOS, T., & BERCIANO, J. (2005). Riesgos competitivos de muerte y equilibrio de Hardy-Weinberg y enfermedades, 19(4), 321–324.

LÓPEZ, N. J., JARA, L., & VALENZUELA, C.Y. (2005). Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 76(2), 234–43.

LORD, P.C., WILMOTH, L.M., MIZEL, S.B., & MCCALL, C.E. (1991). Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 87(4), 1312–1321.

MAO, M., ZENG, X.-T., MA, T., HE, W., ZHANG, C., & ZHOU, J. (2013). Interleukin-1 α -899 (+4845) C→T polymorphism increases the risk of chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis of 23 case-control studies. *Gene*, 532(1), 114–9.

MICHALOWICZ, B., AEPPLI, D., KUBA, R., BEREUTER, J., CONRY, J., SEGAL, N., & PIHLSTROM, B. (1991). A twin study of genetic variation in proportional radiographic alveolar bone height. *J Dent Res*, 70, 1431–1435.

MICHALOWICZ, B., AEPPLI, D., VIRAG, J., KLUMP, D., HINRICHS, J., & SEGAL, N. (1991). Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol*, 62, 293–299.

MORAN, Y., & CHIURILLO, M. A. (2009). Distribution of Interleukin-1 Genetic Polymorphisms in Central-Western Region Individuals of Venezuela. *Acta biol. Colomb*, 14(1), 185–194.

MOREIRA, P.R., DE SÁ, A.R., XAVIER, G.M., COSTA, J.E., GOMEZ, R.S., GOLLOB, K.J., & DUTRA, W.O. (2005). A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *Journal of Periodontal Research*, 40(4), 306–11.

NIKOLOPOULOS, G.K., DIMOU, N. L., HOMODRAKAS, S.J., & BAGOS, P.G. (2008). Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol*, 35(9), 754–767.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2005). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio* (Tercera). Malta.

OTOMO-CORGEL, J., PUCHER, J.J., RETHMAN, M.P., & REYNOLDS, M.A. (2012). State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *The Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 12(3 Suppl), 20–8.

PARMEET, K.M., HEMANT, K.B., & RAMA, D.M. (2005). Ethnicity greatly influences the interleukin-1 gene cluster(IL-1b promoter, exon-5 and IL-1Ra) polymorphisms: a pilot study of a north Indian population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 6(4), 541–546.

PERSSON, G.R., & PERSSON, R.E. (2008). Cardiovascular disease and periodontitis: an update on the associations and risk. *J Clin Periodontol*, 35(8), 362–379.

PETERSEN, P.E. (2003). *The World Oral Health Report 2003. Continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme*. Geneva, Switzerland.

PETERSEN, P. E., & OGAWA, H. (2005). Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *Journal of Periodontology*, 76(12), 2187–93.

ROJO BOTELLO, N.R., FLORES ESPINOZA, A., & ARCOS CASTRO, M. (2011). Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica. *Revista Odontológica Mexicana*, 15(1), 31–39.

ROMERO, B.C., CHIQUITO, C.S., ELEJALDE, L., & BERNARDONI, C.B. (2002). Relationship between periodontal disease in pregnant women and the nutritional condition of their newborns. *J Periodontol*, 73(10), 1177–1183.

SCANNAPIECO F.A. (1999). Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol*, 70, 793–802.

SEVILLA, S.D. (2007). Metodología de los estudios de asociación genética. *Insuficiencia Cardíaca*, 2(3), 111–114.

SHAPIRA L, WILENSKY A, & KINANE D.F. (2005). Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J of Cl Periodontol*, 32, 72–86.

SHOEMAKER, J., PAINTER, I., & WEIR, B.S. (1998). A Bayesian characterization of Hardy-Weinberg disequilibrium. *Genetics*, 149, 2079–2088.

SORIGUER, F., & MORCILLO, S. (2007). ¿Qué hacer cuando en los estudios de epidemiología biomolecular la distribución genotípica no se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg? *Endocrinol Nutr*, 54(3), 169–173.

SOUREN, N. Y. P., & ZEEGERS, M. P. (2011). Is Hardy-Weinberg on its retreat? *Journal of Clinical Epidemiology*, 64(8), 819–20.

SUKUMARAN, A.S.H., & AL-GHAMDI, B.D. (2006). The impact of periodontal infections on systemic diseases An update for medical practitioners. *Saudi Med J*, 27(6), 767–776.

TABOADA VEGA, M.E., OLIVERA GARCÍA, J.E., VALDERRAMA HERRERA, O., CISNEROS ZÁRATE, L., CHUQUIHUACCHA GRANDA, V., REYES SOTO, S., & BALLONA CHAMBERGO, P. (2007). Evaluación del Factor de Necrosis Tumoral (TNF-alfa) en pacientes peruanos con procesos periodontales. *Odontología Sanmarquina*, 10(1), 28–30.

TENG, Y.T., TAYLOR, G.W., SCANNAPIECO, F., KINANE, D.F., CURTIS, M., & BECK, J.D.. (2002). Periodontal health and systemic disorders. *J Can Dent Assoc*, 68, 188–192.

TREVILATTO, P.C., DE SOUZA PARDO, A.P., SCAREL-CAMINAGA, R.M., DE BRITO, R.B., ALVIM-PEREIRA, F., ALVIM-PEREIRA, C.C., & LINE, S. R. P. (2011). Association of IL1 gene polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. *Archives of Oral Biology*, 56(1), 54–62.

VALDERRAMA, G., VIJANDE, F., ESCRIBANO, J., GARRIDO-PERTIERRA, A., & BASCONES, A. (2005). La IL-1 y su eventual asociación con la enfermedad periodontal crónica . Una revisión de la literatura (I). *Av Periodon Implantol*, 17(2), 89–95.

VALDIVIA, N. (2011). El uso de categorías étnico/raciales en censos y encuestas en el Perú: balance y aportes para una discusión. Lima: Grupo de Análisis para el Desarrollo, GRADE.

VARGAS ALARCÓN, G. (2012). La periodontitis y su genética. *Revista Odontológica Mexicana*, 16(4), 236.

VÉLEZ-CASTRILLÓN, S., CAMARGO, J.F., CORREA, P.A., & ANAYA, J. (2004). Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1, 11(1).

WALKER, S., VAN DYKE, T., RICH, S., KORNMAN KS, D., GIOVINE, F., & HART, T. (2000). Genetic polymorphisms of the IL- 1 α and IL-1 β genes in African-American patients and in an African-American control population. *J Periodontol*, 71, 723–728.

WANG, W.F., SHI, J., CHEN, S.J., NIU, Y.M., & ZENG, X.T. (2014). Interleukin-1 α -899 (+4845) C→T polymorphism is not associated with aggressive periodontitis susceptibility: A meta-analysis based on 19 case-control studies. *Biomedical Reports*, 2(3), 378–383.

WEAM BANJAR, M. S., & MUTEH H ALSHAMMARI, M. S. (2014). Genetic factors in pathogenesis of chronic periodontitis. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 9(3), 245–247.

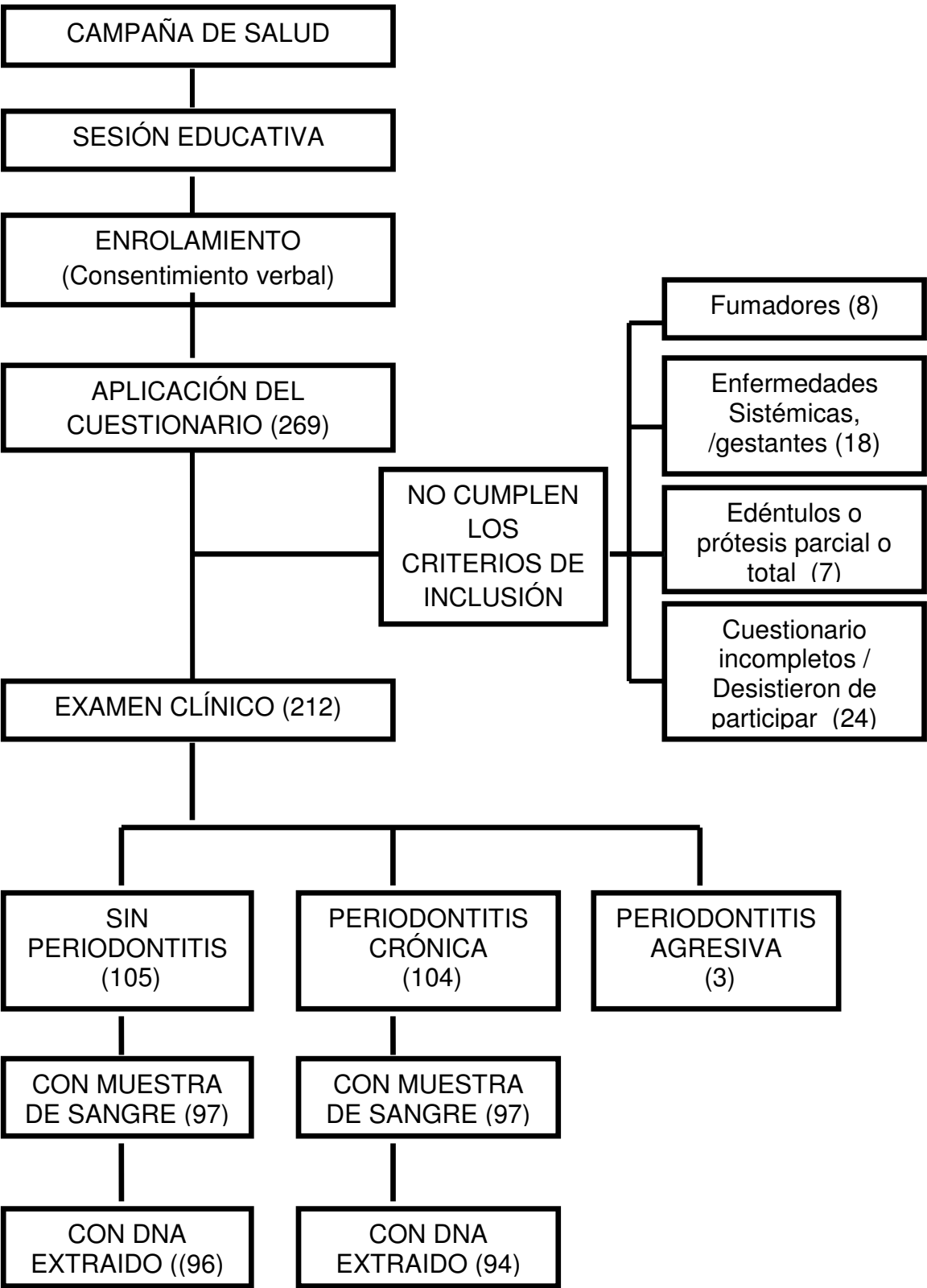
XU, J., TURNER, A., LITTE, J., BLEECKER, E., & MEYERS, D. (2002). Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genetic*, 111(2), 573–4.

YOSHIE, H., GALICIA, J.C., KOBAYASHI, T., & TAI, H. (2005). Genetic polymorphisms and periodontitis. *International Congress Series*, 1284, 131–139.

ZERÓN, A. (2006). Odontología genómica. La medicina oral del siglo XXI. *Revista ADM*, LXIII(2); 52–61.

ANEXOS

ANEXO 1: DISEÑO DEL ESTUDIO



ANEXO 2: PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS

Materiales:

Centrifuga, Refrigeradora, pipetas de 100 – 1000 µl, Tips de 200 µl, Tips de 1000 µl, Gradillas, papel toalla, Lejía 6 %, marcadores indelebles.

Reactivos:

Buffer de lisis TE 20:5 (20 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7,6; autoclavada).

Procedimiento:

1. Las muestras de sangre colectadas fueron centrifugadas a 8000 rpm por 8 min. para crear tres fases (glóbulos rojos, leucocitos, plasma).
2. Luego, con la ayuda de una pipeta de 1000 µl, se extraerá la capa delgada de leucocitos que se encuentra en la interfase, entre el plasma y las células sanguíneas.
3. Se agregará a los leucocitos recuperados una solución hipotónica de lisis de eritrocitos TE 20:5 (20 mM Tris : 5 mM EDTA, pH 7,6; autoclavada), la solución será homogenizada, para que el TE 20:5 destruya de los glóbulos rojos y otras proteínas solubles.
4. El homogenizado será centrifugado nuevamente a 7000 rpm por 8 minutos, este paso de lavado se repetirá hasta obtener el sobrenadante transparente, Finalmente los pellets de leucocitos se los resuspenderá en 200 µl de solución TE 20: 5 y guardadas a -20°C hasta la extracción del ADN.

ANEXO 3: PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Materiales:

Microcentrífuga (14000 rpm), Tubos de centrífuga Eppendorf estériles de 2,0 ml, Micropipetas (0.1-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), tips de 0.5-10ul, tips de 200 ul, tips de 1000 µl.

Reactivos:

TE 20:5 (20 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7,6; autoclavada), TE 20:1 (20 mM Tris pH 7,5-8,0: 1 mM EDTA; autoclavada), Acetato de Amonio (stock 10 M), SDS (Dodecylsulfat- Na – salz; Serva Feinbiochemica Heidelberg> 99%) (Stock 10 % en H₂O destilada), Proteinasa K 1mg/ml, Etanol absoluto 100 % (helado), Etanol 70 % (30 % TE 20:5), NaCl (stock 5 M).

Procedimiento:

1. Agregar a los 200 µl de leucocitos 22.5 µl de SDS (10%), concentración final 1.13%, mezclar latigueando por 5 min hasta obtener una solución viscosa evitando formar espuma. Congelar las muestras a -20°C y luego descongelar a 54°C.
2. Agregar 5 µl de Proteinasa K (500 µg/ml), mezclar e incubar a 54 °C por 3 horas o por toda la noche.
3. Congelar las muestras a – 20 °C, descongelar y agregar TE 20:1 500 µl homogenizar por 5 min.
4. Agregar 500 µl de la Solución Cloroformo alcohol isopropílico 24:1 helado, agitar con fuerza durante 10min.
5. Centrifugar a 5000 rpm por 10 min, recuperar el sobrenadante a otro envase cuidando de no tocar la interface.
6. Agregar 174 µl de Acetato de Amonio a concentración final de 7 M (stock 10 M) y mezclar por 5 min.
7. Agregar 3 volúmenes, (1000 µl) de etanol absoluto (conservado en el congelador), mezclar muy suavemente rotando el tubo e invirtiendo varias veces hasta obtener una pelusa flotante
8. Para aumentar la eficiencia, se deja de un día para otro a -20°C.

9. Centrifugar a 14000 rpm x 3min decantar y agregar 1 ml de una solución de 70 % de etanol, mezclar, para eliminar las proteínas remanentes y el acetato de amonio. Volver a centrifugar a 14000 rpm x 3min Eliminar el sobrenadante.
10. Agregar TE 20:5 (500 µl) + Na Cl (20 µl, concentración final 0.2 M) para resuspender la pelusa y mezclar suavemente hasta solubilizar completamente
11. Agregar 3 volúmenes de etanol helado (1000 µl) y mezclar por inversión hasta obtener de nuevo la pelusa.
12. Repetir el paso 8 y dejar por 30 min secando boca abajo sobre un papel toalla.
13. Agregar buffer TE 20:1 de 50 a 500 µl según el tamaño del precipitado
14. Conservar la muestra de DNA a 4°C durante 1 semana antes de guardarlo a -20 °C.

ANEXO 4: PROTOCOLO - RFLP PARA IL-1A C(-889)T

Materiales:

Micropipetas (0.01 µl – 2 µl, 0.1-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), Tips de 10 µl Tips de 200 µl, Tips de 1000 µl, microtubos (1.5 ml, 0.5 ml y 0.2ml), gradillas, Paraflim, papel toalla, horno microondas, probetas, matraz, cámara electroforética horizontal, fuente poder, transiluminador UV.

Reactivos:

Amplificación de DNA

- dNTPs mix 10Mm 200 µl PROMEGA
- Taq polimerasa (10 Taq Buffer with (NH₄)₂SO₄, 25mM MgCl₂, Taq polimerasa 100u (5u/µl) FERMENTAS
- Primer: IL-1A C(-889)T Forward: 5'-AAG CTT GTT CTA CCA CCT GAA CTA GGC-3'
- Primer: IL-1A C(-889)T Reverse: 5'-TTA CAT ATG AGC CTT CCA TG-3'
- Agua para PCR

Vizualización de Amplificados

- Step Ladder marker: Gene Ruler™ bp DNA Ladder ready to use 50-1000pb Fermentas®
- Top Vision™ agarose Fermentas®
- 6X DNA loading Dye
- Syber Green in DMSO 10,000 x 400 µl, Invitrogen®
- Buffer TBE 1X.

Fragmentos de Restricción

- Agua para PCR
- Enzima de Restricción *Nco*I Fermentas® (Buffer Tango™ 1X, *Nco*I 10u/ µl).

Vizualización de Fragmentos de restricción

- Step Ladder marker, 10 bp- 100pb Promega®
- Buffer TBE 1X

- Solución de fijación: Etanol 95% (100 mL), Ácido Acético (5 mL), agua bidestilada (895 mL)
- Solución de tinción : AgNO₃ (1g), agua bidestilada (1l)
- Solución de revelado: NaOH (15 g), Formaldehído 37% (4 mL), enrasar a 1l con agua bidestilada.

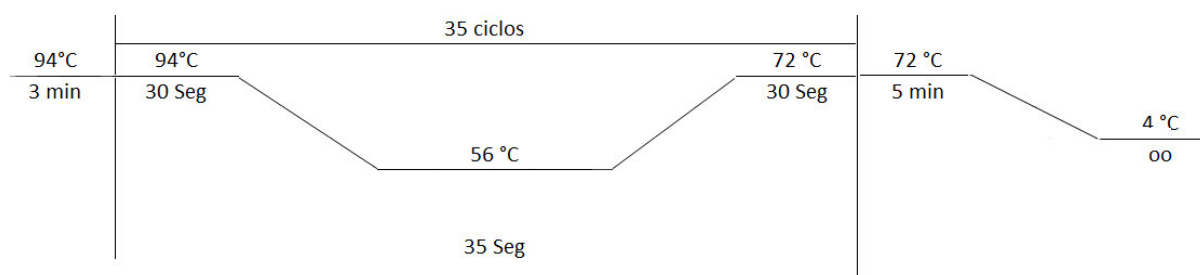
Procedimiento

1. Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para IL-1A C(-889)T.

Tabla 16. Protocolo para el Mix de PCR IL-1A C(-889)T, volumen de reacción 50 µl.

COMPONENTE	CC STOCK	CC PCR	VOLUMEN 1X (µl)
Agua para PCR			
Buffer Taq 10 X (NH₄)₂SO₄			5
Mix dNTPs	40mM	0.8mM	1
Primer Forward	109.5µM	1 µM	0.46
PrimerReverse	89.2µM	1 µM	0.56
Taq polimerasa	5µ/ul	0.25 µ/µl	0.25
MgCl₂	25mM	2.5 mM	5
DNA		100ng	
Volumen total			50

Tabla 16. Protocolo para el Mix de PCR IL-1A C(-889)T, volumen de reacción 50 µl.



2. Visualización de Amplificados

Gel de electroforesis de agarosa: Se preparó un gel de agarosa al 2.4 % con TBE 1X y 0.6 µl de *Syber Green*, finalmente 8 µl de muestra fueron combinados

con 2 µl de *Loading buffer* y corridas a 120 V por 40 min en una cámara de electroforesis horizontal.

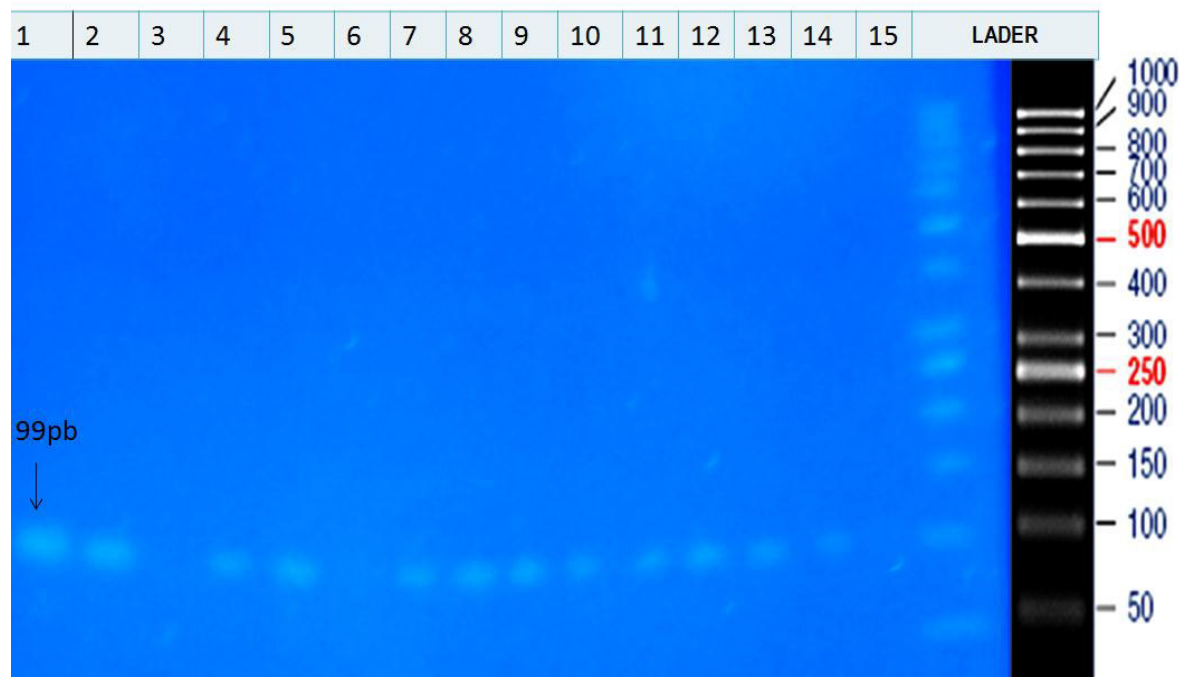


Figura 6. Amplificados de IL-1A C(-889)T de 99 pb, en gel de agarosa Top Vision™ al 2.4% , tinción Syber-Green 0.012%. También se observa el patrón de bandas del ladder Gene Ruler™ de 50 -1000 pb Fermentas®.

3. Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) para IL-1A C(-889)T

Tabla 17. Protocolo para el Mix de restricción para amplificados IL-1A C(-889)T, volumen de reacción 31.5 µl

COMPONENTE	CC STOCK	CC RFLP	VOLUMEN 1X (µl)
Agua para PCR			18
Buffer tango 1 X	1X	----	2
Enzima de Restricción <i>Nco I</i>	10 u/µl	----	1.5
Producto de PCR (Amplificados)	-----	----	10
Volumen Total			31.5
Mezclar suavemente por algunos segundos e incubar a 37°C por 4 horas.			
PRODUCTOS	C (1)	83+16 pb	Normal
	T (2)	99 pb	Riesgo

4. Visualización de Fragmentos de restricción

Gel de electroforesis de poliacrilamida: Se preparó un gel de poliacrilamida al 8%, finalmente 8 µl de muestra fueron combinadas con 2 µl de *Loading buffer* 6X y corridas a 120 V por 1h 30 min. en cámara de electroforesis vertical. y sometida a tinción con Nitrato de Plata .

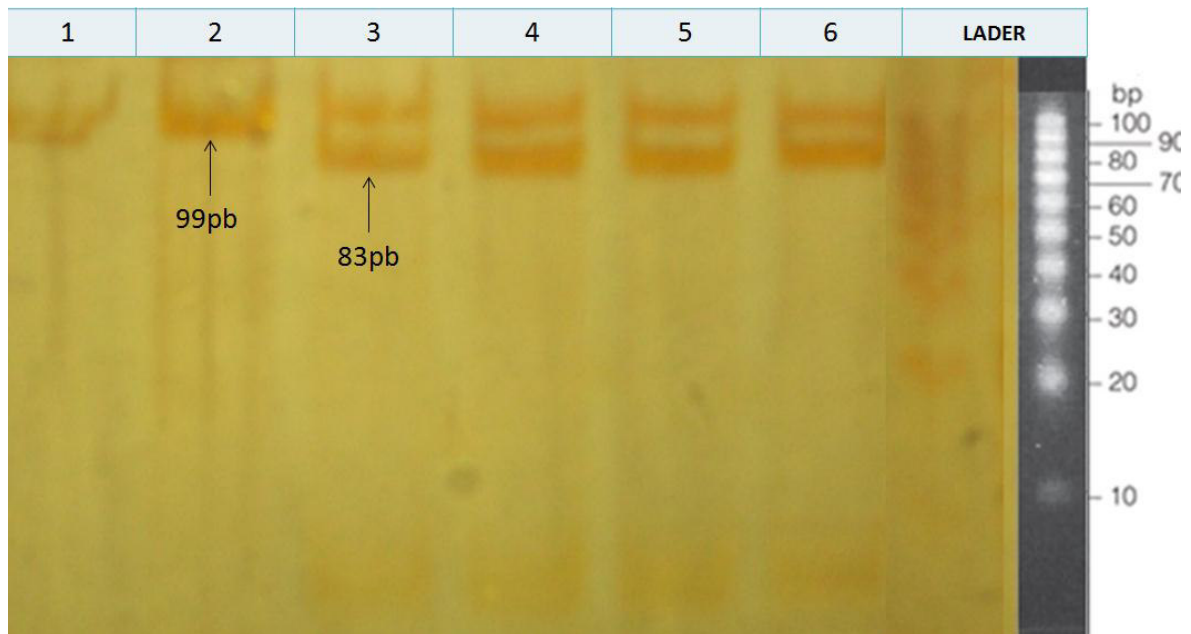


Figura 7. Fragmentos de restricción de IL-1A C(-889)T de 99pb y 83pb en gel de poliacrilamida al 8%, tinción nitrato de plata. También se observa el patrón de bandas del Ladder Marker de 10 bp- 100 pb, Promega®.

ANEXO 5: PROTOCOLO- RFLP PARA IL-1B C(+3953/4)T

Materiales:

Micropipetas (0.01 µl – 2 µl , 0.1-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), Tips de 10 µl Tips de 200 µl, Tips de 1000 µl, microtubos (1.5 ml, 0.5 ml y 0.2ml), gradillas, Paraflim, papel toalla, horno microondas, probetas, matraz, cámara electroforética horizontal, fuente poder, transiluminador UV.

Reactivos:

Amplificación de DNA

- dNTPs mix 10Mm 200 µl Promega®
- Taq polimerasa (10 Taq Buffer with (NH₄)₂SO₄, 25mM MgCl₂, Taq polimerasa 100u (5u/ µl) Fermentas®
- , Primer: IL-1B C(+3953/4)T Forward: 5'-CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAAA-3'.
- Primer: IL-1B C(+3953/4)T Reverse: 5'-GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG-3'.
- Agua para PCR.

Vizualización de Amplificados

- Step Ladder marker: Gene Ruler TM bp DNA Ladder ready to use 50-1000pb Fermentas®
- Top Vision TM agarose Fermentas®.
- 6X DNA loading Dye
- *Syber Green in DMSO* 10,000 x 400 µl Invitrogen ®
- Buffer TBE 1X.

Fragmentos de Restricción

- Agua para PCR
- Enzima de Restricción *TaqI* (Buffer Tango TM 1X, *Taq I* 10u/ µl), Promega®

Vizualización de Fragmentos de restricción

- Step Ladder marker, Gene Ruler TM bp DNA Ladder ready to use 50-1000pb Fermentas®.

- Buffer TBE 1X
- Solución de fijación: Etanol 95% (100 mL), Ácido Acético (5 mL), agua bidestilada (895 mL)
- Solución de tinción : AgNO₃ (1g), agua bidestilada (1l)
- Solución de revelado: NaOH (15 g), Formaldehído 37% (4 mL), enrasar a 1l con agua bidestilada.

Procedimiento

1. Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para IL-1B C(+3953/4)T

Tabla 18. Protocolo para el Mix de PCR IL-1B C(+3953/4)T, volumen de reacción 50 µl.

COMPONENTE	CC STOCK	CC PCR	VOLUMEN 1X (µl)
Agua para PCR			
Buffer Taq 10 X (NH₄)₂SO₄			5
Mix dNTPs	40mM	0.8mM	1
Primer Forward	61.6µM	1 µM	1.232
Primer Reverse	88.3µM	1 µM	1.766
Taq polimerasa	5µ/ul	2.5 u/µl	0.5
MgCl₂	25mM	2.5 mM	5
DNA		100ng	


```

graph TD
    A[95°C 2min] --> B[95°C 1min]
    B --> C[67.5°C 1min]
    C --> D[72°C 1min]
    D --> E[72°C 5min]
    E --> F[4°C]
    subgraph "35 ciclos"
        B
        C
        D
    end
  
```

1. Visualización de Amplificados

Gel de electroforesis de agarosa: Se preparó un gel de agarosa al 2.4 % con TBE 1X y 0.6 µl de *Syber Green*, finalmente 8 µl de muestra fueron combinadas

con 2 µl de *Loading buffer* y corridas a 120 V por 40 min. en una cámara de electroforesis horizontal.

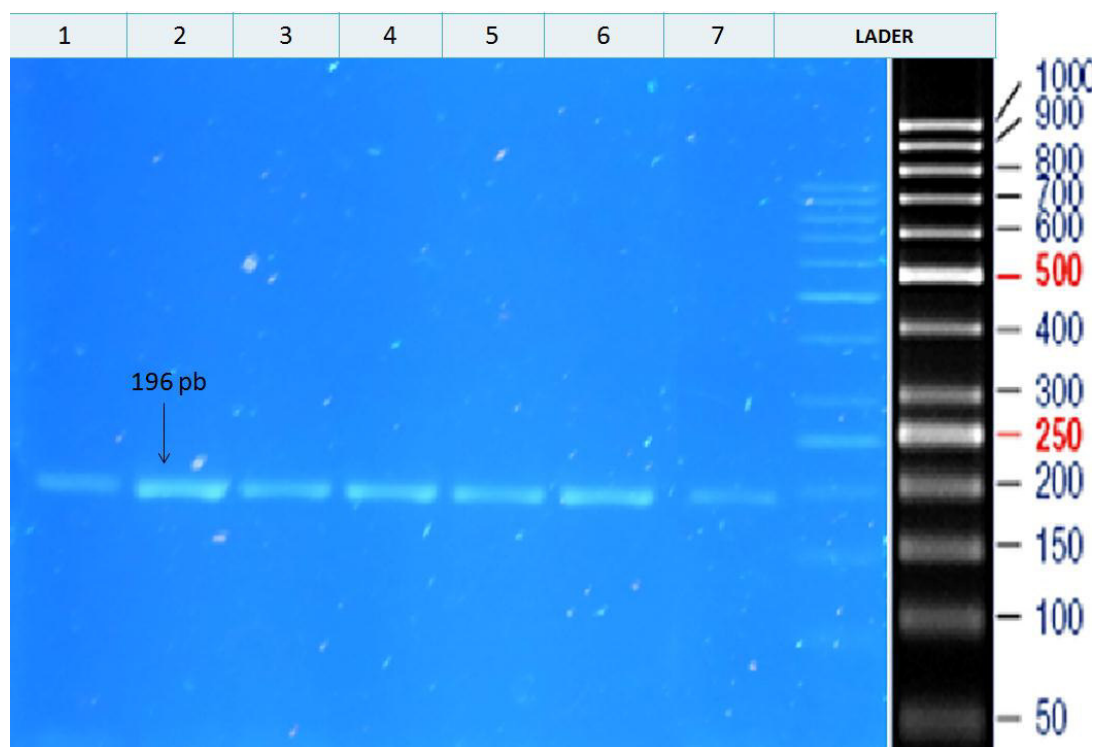


Figura 8. Amplificados de IL-1B C(+3953/4)T de 196 pb, en gel de agarosa Top Vision™ al 2.4%, Tinción Syber-Green 0.012%. También se observa el patrón de bandas del ladder Gene Ruler™ de 50 -1000 pb, Fermentas®.

2. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para IL-1B C(+3953/4)T

Tabla 19. Protocolo para el Mix de restricción para Amplificados IL-1B C(+3953/4)T Volumen de reacción 31.5 µl.

COMPONENTE	CC STOCK	CC RFLP	VOLUMEN 1X (µl)
Agua para PCR			18
Buffer tango 1 X	1X	----	2
Enzima de Restricción <i>Taq I</i>	10 u / µl	----	1.5
Producto de PCR (Amplificados)	-----	----	10
Volumen Total			31.5
Mezclar suavemente por algunos segundos e incubar a 65°C por 4 horas.			
PRODUCTOS	C (1)	85+97+12	Normal
	T (2)	182+12	Riesgo

3. Visualización de Fragmentos de restricción

Gel de electroforesis de poliacrilamida: Se preparó un gel de poliacrilamida al 8 %, finalmente 8 µl de muestra fueron combinadas con 2 µl de *Loading buffer* 6X y corridas a 120 V por 1h 30 min en cámara de electroforesis vertical. y sometida a tinción con Nitrato de Plata.

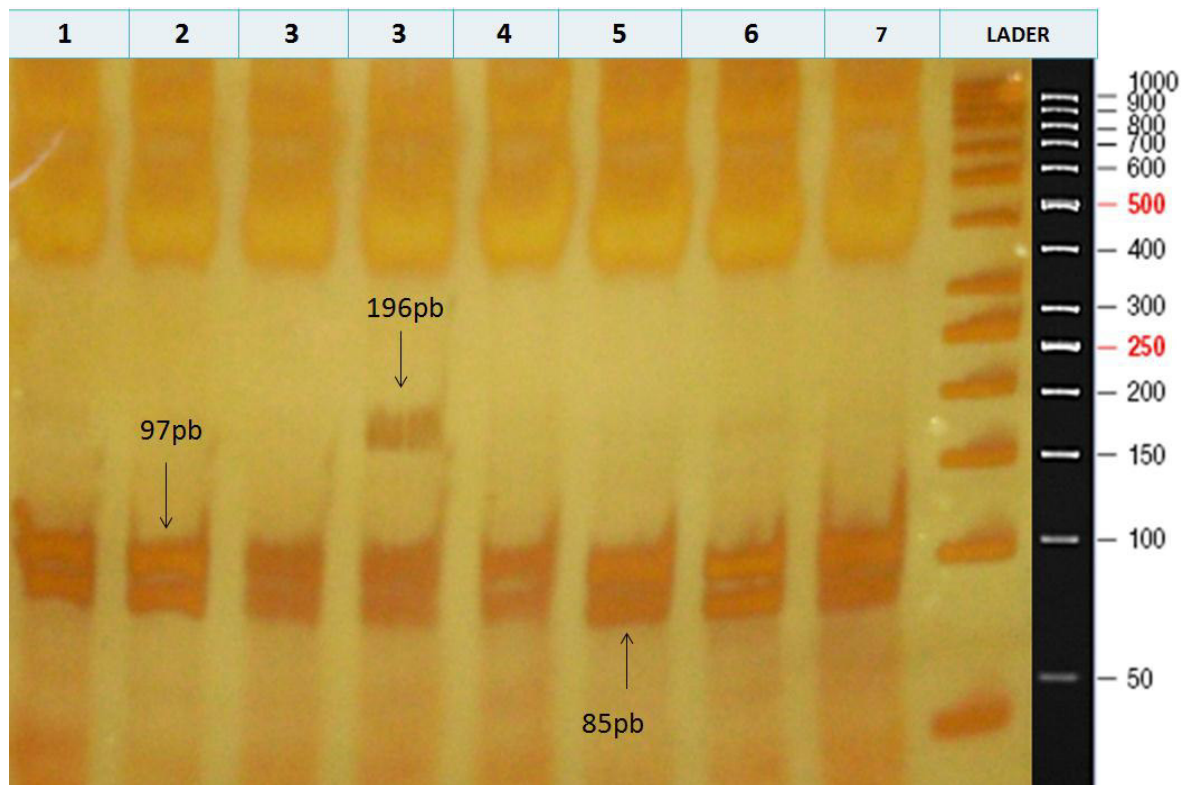


Figura 9. Fragmentos de restricción de IL-1B C(+3953/4)T de 196 pb, 97 pb y 85pb en gel de poliacrilamida al 8%, tinción nitrato de plata. También se observa el patrón de bandas del ladder Gene Ruler TM de 50 -1000 pb, Fermentas®.

**ANEXO 6: ACTA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO Y CONSENTIMIENTO
INFORMADO Y FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

FECHA: 16 de Enero de 2012

PROYECTO: "ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LAS IL-1A C (-889)T Y IL-1B C(3953/4)T CON EL DESARROLLO DE PERIODONTITIS CRÓNICA EN UNA POBLACIÓN PERUANA"

INVESTIGADOR SOLICITANTE: Bióloga Ivonne Fanny REYES MANDUJANO

INSTITUCIÓN O LUGAR DE EJECUCIÓN: Laboratorio de Genética Molecular, Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina Humana- UNMSM.

La señorita bióloga Ivonne Fanny REYES MANDUJANO alcanzó al comité de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM, una solicitud de aprobación de proyecto y del consentimiento informado a ser utilizado en su proyecto de investigación para optar el grado de magíster en Biología Molecular, siendo el mismo registrado en la Facultad de Ciencias Biológicas.

El proyecto y la documentación pertinente solicitada, incluyó información adicional a la solicitante para la aclaración de algunos puntos de parte de los miembros del comité.

Sobre la base de los postulados de la declaración de Helsinki, guía internacional de ética para la investigación biomédica CIOMS, reglamento nacional de ensayos clínicos 2006 y modificatoria 2007, la información proporcionada por el solicitante ha sido analizada, el comité considera que el proyecto propuesto no implica riesgos físicos, psíquicos o sociales, para los sujetos involucrados. El consentimiento informado versión última con las observaciones levantadas presentado en fecha 11 de Enero de 2012, también ha sido revisado.

En virtud de las consideraciones expuestas el comité otorga la aprobación para la realización del estudio propuesto y la utilización de su documento de consentimiento informado.


Mg. MARTHA VALDIVIA CUYA
PRESIDENTA

[illegible]

se divulgará por ningún medio hablado y/o escrito. Se le tomará una pequeña muestra de sangre (4 ml) del brazo para los análisis genéticos.

Solo le molestaremos por una sola vez, es decir en el momento de la entrevista y la toma de muestra. El tiempo estimado, de su participación, es de unos 30 minutos aproximadamente.

¿Cuáles son los beneficios esperables y los riesgos potenciales del estudio?

No tendrá un beneficio directo pero, se le informará acerca de la Enfermedad Periodontal y otras que afecten la Salud Bucal, como prevenirlas y tratarlas, además usted puede realizar las consultas con respecto a la periodontitis u otras enfermedades de la boca , con los investigadores odontólogos que participen en este trabajo de investigación .

Los efectos secundarios de una extracción de sangre son poco comunes pero podrían incluir: mareos, dolor, formación de hematomas; estos se deben más a la condición misma del paciente que al procedimiento en sí.

Su participación es voluntaria y puede negarse a participar en cualquier momento, sin perder sus beneficios, como participante de la campaña.

Confidencialidad y protección de datos de carácter personal

Desde ya toda la información obtenida es de la más estricta confidencialidad. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, su identidad no será revelada a persona alguna. Los resultados del estudio podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones. Los datos podrán ser utilizados solo con fines de carácter científico.

Deseo conocer los resultados del análisis molecular de estos genes : SI ☐

NO ☐

Enviar a correo

electrónico: _____

Contactos para responder cualquier duda o pregunta sobre este proyecto:

Dr. Apolonia G. Salazar

Puede comunicarse con Blga. Ivonne Fanny Reyes Mandujano, llamándola al **994550633** ó a través de su correo electrónico **ivonnefanny@hotmail.com**.

Yo,..... He leído la hoja de información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el estudio. He recibido suficiente información sobre el estudio. He hablado conHe tenido tiempo suficiente para considerar de manera adecuada mi participación en el estudio. Comprendo que mi participación es voluntaria. Comprendo que puedo retirarme del estudio, cuando quiera y sin tener que dar explicaciones.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del participante

(Huella dactilar en caso analfabetismo)

Fecha_____

Manuscrita por el paciente

Firma del investigador

Nombre/DNI:

Fecha_____

Manuscrita por el investigador

Yocomo entrevistador de.....

.....acepto mis responsabilidades en este estudio como se describe en la hoja de información y presto libremente mi conformidad a colaborar en este estudio.

Firma del Entrevistador

entrevistador

Nombre/DNI:

Fecha_____

Manuscrita por el